

DOCUMENT NO. _____
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



WIPO

PCT

EP 00/07253

199 35 115.5

27. Juli 1999

BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Elektronendonorsystem für Enzyme und
dessen Anwendung bei der Biochemischen
Umsetzung von Substraten

C 12 P, C 12 M, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Der Präsident
Im Auftrag

Im Auftrag

Agurks

A 9161
06/00
EDV-L

Elektronendonorsystem für Enzyme und dessen Anwendung bei der Biochemischen Umsetzung von Substraten

5

Die Erfindung betrifft ein ~~neuartiges~~ Elektronendonorsystem für Enzyme mit ~~Redox~~eigenschaften, und dessen Verwendung in enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der Herstellung ω -hydroxylierter Fettsäuren. Die Erfindung betrifft
10 außerdem ein verbessertes Nachweisverfahren für Fettsäuremonooxygenasen, Bioreaktoren sowie Testkits, worin das Elektronendonorsystem vorteilhaft einsetzbar ist.

15

Die biotechnologische Nutzung von Enzymen mit Redoxeigenschaften, wie z.B. von Monooxygenasen, in ~~zellfreien~~ Reaktionssystemen ist grundsätzlich mit ~~dem Problem~~ behaftet, daß die Verwendung ~~natürlicher Cofaktoren zur Bereitstellung der erforderlichen Redox-Äquivalente~~ (wie z.B. von ~~NADH oder NADPH~~) mit unverhältnismäßig hohen Kosten verbunden ist.

20

Dies gilt auch für die biotechnologische Nutzung von Cytochrom P450 ~~haltige~~ Monooxygenasen. Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, Sauerstoff-Atome auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische X-H (x = -C, -N, -S) Bindungen zu übertragen. Darüber hinaus vermögen P450-Enzyme -C=C- Doppelbindung zu epoxidieren. Für diese Oxygenierungsreaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren, wie NADPH oder NADH, als Elektronenquelle. Entsprechend der Realisierung dieses e-Transfersystems (Reduktasesystems) unterteilt man P450-Systeme in
30 vier Klassen. Klasse I ~~P450-Enzyme~~ enthalten als Reduktase

eine FAD-Domäne und ein weiteres Fe-S-Protein (zumeist mitochondriale und bakterielle P450-Enzyme), Klasse II P450-Enzyme besitzen eine FAD/FMN-Reduktase (meist ER-P450-Enzyme) und Klasse III P450-Enzyme benötigen keine weiteren Reduktions-
35 äquivalente, sie setzen peroxygenierte Substrate um, die den Sauerstoff bereits enthalten. Das einzige P450-Enzym der Klasse IV erhält seine Elektronen direkt ohne Transfersystem von NADH.

Die funktionelle Vielfalt der durch P450-Systeme katalysierten Monooxygenierungen auf chemischem Wege häufig nur schwer zugänglicher Verbindungen bieten ein enormes biotechnologisches, pharmakologisches und toxikologisches Potential. Eine wichtige Voraussetzung zur *in vitro* Nutzung dieser Potentiale ist die Entwicklung geeigneter Expressions-, Reinigungs- und vor allem Aktivitätsnachweissysteme, die erlauben, P450-Systeme zu charakterisieren und Enzymvarianten mit "verbesserten" Eigenschaften aufzufinden.

10

Weitere wichtige Voraussetzung für die Nutzung dieser p450 Monooxygenasen, insbesondere der Klassen I und II, wäre die Verfügbarkeit eines kostengünstigen Elektronendonorsystems.

- 15 Ein NADPH-Cofaktor-Recycling-System wurde von Deffner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (1987) 501, 171 vorgestellt. Dieses stellt aber bei Anwendung im präparativen Maßstab ein Kostenproblem dar und gestaltet Reaktionsführungen in Enzym-Membran-Reaktoren komplizierter. Deshalb wurde nach alternativen
- 20 Elektronendonoren gesucht. Ein vielversprechenden Weg stellt die elektrochemische Reduktion von P450-Enzymen dar. Estabrook et al. (Methods Enzymol. (1996) 272, 44) konnten mittels eines Co(III)sepulchrat-Mediatorsystems und Pt-Elektroden für sechs verschiedene P450-Enzyme Umsätze bestimmen. Die Aktivitäten waren jedoch etwa 8-fach geringer als beim Reduktionsäquivalent NADPH. Statt des Mediators wurde in Natriumdithionit (Fang et al., Drug. Metab. Dispos. (1996) 24(11): 1282) eine Verbindung gefunden, die P450-Enzyme direkt reduziert. Im Falle von P450 BM-3 war die Aktivität mit Natriumdithionit gegenüber NADPH um
- 30 Faktor 8150 reduziert; vermutlich wird P450 BM-3 durch Natriumdithionit dreifach reduziert und damit großteils inaktiviert.

Kurze Beschreibung der Erfindung

35

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein kostengünstiges, effizientes, alternatives Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften bereitzustellen. Insbesondere sollte dieses

System in biochemischen Umsetzungen verwendbar sein, an welchen Cytochrom P450-haltige Enzyme beteiligt sind. Außerdem sollte ein verbessertes Nachweisverfahren für p450-Enzyme

- ~~bereitgestellt werden. Eine weitere Aufgabe der Erfindung~~
- 5 bestand ~~in der Bereitstellung eines verbesserten~~ biotechnologischen Verfahrens zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf organische Moleküle und insbesondere zur terminalen oder subterminalen Hydroxylierung von Fettsäuren.
- 10 Diese Aufgaben wurde überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Elektronendonorsystems für die Übertragung von Elektronen auf Enzyme mit Redox-Eigenschaften, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt,
- 15 der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist. Dabei können die Komponenten des Systems einzeln oder im Gemisch, in getragener oder vorzugsweise ungetragener Form vorliegen.
- 20 Das erfindungsgemäß bereitgestellte Elektronendonorsystem ist insbesondere für Cytochrom P450-haltige Enzyme, wie z.B. die in der großen Familie der Monooxygenasen (E.C. 1.14.-.-) zusammengefassten Enzyme, anwendbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Elektronendonorsystems umfaßt dieses einen Mediator mit einem Standard-Normalpotential im Bereich von weniger als etwa -0,4 V. Nichtlimitierende Beispiele für Mediatoren sind Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen, Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN

30 und FAD, wobei Kobalt(III)sepulchrat bevorzugt ist.

- Das erfindungsgemäße Elektronendonorsystem umfaßt vorzugsweise als Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator. Als nichtlimitierendes
- 35 Beispiel für die Elektronenquelle ist metallisches Zink zu nennen. Das Metall liegt dabei vorzugsweise in einer reaktiven Form, d.h. mit großer Oberfläche, wie z.B. pulverförmig, vor.

Bevorzugte erfindungsgemäße Elektronendonorsysteme umfassen, folgende Kombinationen von Elektronenquelle und Mediator:

- Zn/Kobalt(III)sephulchrat oder
- Zn/Neutralrot.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von, d.h. Übertragung von Sauerstoff auf, ein Kohlenwasserstoff-haltiges

Wasserstoffdonor-Molekül, das dadurch gekennzeichnet ist, daß
 10 man das Wasserstoff-Donormolekül in einem Reaktionsmedium, umfassend das Sauerstoff-übertragenden Enzym und ein Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition, in Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen inkubiert.

15 Eine "Oxidation" im Sinne der vorliegenden Erfindung betrifft enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen im weitesten Sinne. Insbesondere umfaßt der Begriff Oxidationsreaktionen welche Enzymen aus der Klasse der von Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-) und vor allem von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert werden. Diese
 20 Oxidationsreaktionen umfassen:

- a) Kohlenstoff-Oxidationen an gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatomen
- b) Schwefel-Oxidationen;
- c) Stickstoff-Oxidationen;
- d) oxidative Dealkylierungen; und
- e) oxidative Dehalogenierungen.

Dabei ist das Wasserstoff-Donormolekül vorzugsweise ausgewählt
 30 unter Verbindungen der Formel



worin

R für einen geradkettigen oder verzweigten, vorzugsweise geradkettigen, Alkylrest mit 10 oder mehr Kohlenstoffatomen,
 35 wie z.B. 10 bis 30 Kohlenstoffatomen, steht, und
 X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril, Sulfat-, Sulfon-, Amin- oder Hydroxygruppe, steht.

Eine bevorzugte Variante obigen Verfahrens betrifft die enzymatische Herstellung terminal oder subterminal (d.h. in Position ω -1 bis ω -4) hydroxylierter Fettsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

5

a) ~~eine hydroxylierbare Fettsäure oder Fettsäurederivat~~ in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase und Sauerstoff umgesetzt; und

10

b) das (die) hydroxylierte(n) Produkt(e) isoliert.

Das ω -hydroxylierbare Fettsäurederivat ist erfindungsgemäß bevorzugt ausgewählt unter terminal gesättigten, verzweigten oder
 15 ~~unverzweigten Fettsäuren mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen,~~
 insbesondere C_{12} - C_{30} -Fettsäuren.

In den ~~oben beschriebenen~~ erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man bevorzugt als Enzym eine Cytochrom P-450 ~~Monooxygenase~~, die
 20 ausgewählt ist unter:

- dem aus ~~Bacillus megaterium~~ (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder
- einer durch Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Position 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 erhältlichen Mutanten des Wildtypenzyms.

Bevorzugt eingesetzte Mutanten umfassen eine Mutation in Position 87 und sind ausgewählt unter den Mutation F87A oder F87V die gegebenenfalls wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen

~~30 aufweist: L188K, A74G, R47F und V26T. Besonders bevorzugt ist die~~

Einfachmutante F87A und die Fünffachmutante F87A, L188K, A74G, R47F, V26T (Angabe der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code; ursprüngliche Aminosäure links von der Positionsangabe; neue Aminosäure rechts von der Positionsangabe).

35

Vorzugsweise werden obige Verfahren unter Verwendung des Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sepulchrat durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens führte man die Umsetzung in Gegenwart von Chloridionen durch.

5 Außerdem kann die Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms vorteilhaft sein.

10 Eine weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen Bioreaktor zur Verwendung bei der enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, und insbesondere zur Verwendung bei der Herstellung ω -hydroxylierter Fettsäuren, der gekennzeichnet ist durch eine immobilisierte Monooxygenase und ein Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition im flüssigen Reaktionsmedium.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 20 a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer ω -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, abspaltbaren Fluorophors oder Chromophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition inkubiert; und
- b) die Abspaltung des Fluorophors oder Chromophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

Die Umsetzung führt man dabei bevorzugt in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms und gegebenenfalls in
30 Gegenwart von Chloridionen durch.

Beispiele für geeignete Fluorophore und Chromophore sind Phenole, Catechole, Hydroxycoumarine, wie Umbelliferon, Phenoxazine und insbesondere Resofurin.

35

Die Einstellung der optimalen Verfahrenspatameter ist unter Berücksichtigung der Anweisungen im folgenden experimentellen Teil ohne weiteres möglich. So erzielt man z.B., ohne darauf

beschränkt zu sein, eine Cobalt(III)sepulchrat-Konzentration von mehr als 0,1 mM, wie z.B. 0,5 bis 1,0 mM besonders vorteilhaft; ebenso wie ein pH-Wert etwa 8 bis 8,5; eine Zink-Konzentration von mehr als etwa 2mg/ml wie z.B. etwa 5 bis 50mg/ml

5

Schließlich betrifft die Erfindung als weiteren Gegenstand einen Testkit, umfassend ein Elektronendonorsystem nach obiger Definition.

- 10 Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung wird in den folgenden Anschnitten weiter erläutert.

Katalysierte Reaktionen von P450-Systemen und Beispiele industrieller Anwendungen in der Feinchemikaliensynthese

15

In Organismen dienen Cytochrom P450-Enzyme unter anderem der Ergosterol-Synthese, der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen, der Ausbildung von Fruchtgröße, Geruch und Farbe bei Pflanzen, der Biosynthese von Gluko- und Mineralkortikoiden, der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen, dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von normalem und epitheliale

20 Wachstum/Differenzierung, Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen und der Bildung vasoaktiver Produkte. Darüber hinaus dienen sie zur Aktivierung und Detoxifizierung xenobiotischer Stoffe.

P450-Enzyme gehören zu den sogenannten Phase I Enzymen, die mittels Oxygenierungen wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Dazu

30 dienen Phase II-Enzyme wie Glutathion-Transferasen, N-

Acetyltransferase oder Sulfotransferase, die eine polare Gruppe an jene hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen addieren. Dadurch werden diese Metabolite wasserlöslich und somit

bioverfügbar. Die Vielfalt von Reaktionen, die durch Cytochrom

- 35 P450-Enzyme katalysiert werden, sind im folgenden zusammengefaßt und hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen und funktionellen Bedeutung diskutiert. Eine Übersicht, aufgeschlüsselt anhand ausgewählter Familien findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1

	P450-Familie	Reaktionen von P450 Enzymen
5	CYP1-3	Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; CYP1: PCB, PAH, Dioxine, Aflatoxine; CYP2: Pflanzentoxine, Pestizide; CYP3: Cyclosporine, Erythromycin, ferner beteiligt am Steroidmetabolismus
	CYP4, CYP52, CYP102	CYP4, CYP52, CYP102: terminale und/oder subterminale Oxidation von Fettsäuren CYP4: Oxidation von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen)
10	CYP11, CYP17, CYP21	Biosynthese von Gluko- und Mineralcorticoiden; CYP11: 11- β -Hydroxylasen, Hydroxylierung von Deoxycorticosteron oder Deoxycortisol; CYP17: Steroid-17 α -hydroxylase; CYP21: Steroid-21-hydroxylase
	CYP19	Umsetzung von Steroiden zu Östrogenen; Aromatase
	CYP27	Cholesterol-27-hydroxylase

15

Die P450-Enzyme der Enzymfamilien CYP1-3 sind hauptverantwortlich für die Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; die dabei auftretenden oxidativen Reaktionen sind im folgenden unterteilt

20 in C-, S-, N-Oxidation, Dealkylierung- und Dehalogenierung.

a) C-Oxidationen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C-H-

25 Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen. Die gebildeten Metabolite sind häufig toxisch, wie das Nervengift 2,5-Hexandion oder karzinogen wie DNA-alkylierende Epoxide (z. B. Styroloxid). Ferner wirken durch P450-Enzyme C-oxidierte Nitrosamine und Benzpyrene karzinogen.

30

Arzneimittel, wie Barbiturate und Phenobarbitale, werden ebenfalls durch P450-Enzyme in ihre Wirkform überführt. Die Hydroxylierung nicht aktivierter -C-H Bindungen ist wegen der seltenen Konkurrenz durch chemische Verfahren eine der nützlichsten Biotransformationsreaktionen. Im Gegensatz zu Radikalreaktionen zeigen Bio-Hydroxylierungsreaktionen an C-Atomen folgende Aktivitätsreihe: sekundär > tertiär > primär. Bekannte industriell durchgeführte Verfahren sind die Progesteron-Hydroxylierung an 11 α -Position mittels *Aspergillus niger*, die etwa die Hälfte der 37 konventionellen Schritte erübrigte, und die 7 β -Hydroxylierung von 3 α -Hydroxy-5 β -cholsäure durch *Fusarium equiseti*. Das Produkt Ursodesoxycholsäure vermag Cholesterin aufzulösen und wird in der Behandlung von Gallensteinen eingesetzt. In der asymmetrischen Synthese werden Biotransformationen unter anderem zur Synthese von β -Hydroxybuttersäure, einem Ausgangsmaterial für Vitamin-synthesen (α -Tocopherol), von Geschmacksstoffen, von Antibiotika (Calcimycin) und von chiralen verzweigten epoxidierten Alkenen verwendet.

20

b) N-Oxidation / S-Oxidation

P450-Enzyme hydroxylieren Aryl- und Acetylamine wie Benzidin, 4-Biphenylamin und 2-Acetaminofluoren und vergleichbare Heterozyklen, die beim Anbrennen von Nahrungsmitteln entstehen, am N-Atom. Nach weiterer Acetylierung oder Sulfonierung der Hydroxygruppen entstehen elektrophile, stark karzinogen wirkende Substanzen.

30 Aryl- und Alkylthioether werden durch P450-Monooxygenasen direkt am S-Atom zu Sulfoxiden oxidiert. Die Oxidation bleibt jedoch häufig nicht auf der Stufe des Sulfoxids stehen; viele Sulfoxide werden zu den entsprechenden Sulfonverbindungen weiteroxidiert, die häufig zelltoxisch wirken. Mikrobielle Oxidationen von
35 chiralen Dithioacetalen gelingen mit hohem Enantiomerenüberschuß mit *Corynebacterium equi* und *Helminthosporium sp.*

c) Oxidative Dealkylierungen

P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative O-, N- und S-Dealkylierung. Beispiele dieser wichtigen Reaktionen sind die O-Dealkylierung von Codein, Mescaline, Phenacetin, die N-Dealkylierung von Ephedrin, Methamphetamin, Aminopurin und die S-Dealkylierung von 6-Methylthiopurin zu 6-Methylpurin.

d) Oxidative Deaminierung

P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative Deaminierung von Aminen. Diese Reaktion hat primär eine Entgiftungsfunktion für den Organismus. Histamin, Noradrenalin und Mescaline können unter anderem auf diese Weise deaminiert werden.

15 e) Oxidative Dehalogenierung

Viele halogenierte Alkane und Alkene bilden nach Hydroxylierung an einer -C-H Bindung ein instabiles Intermediat, das in ein Aldehyd oder Keton und H-Hal dissoziiert. Beispiele sind die Oxidation von Ethendibromid zu 2-Bromacetaldehyd und die Oxidation von Chloroform zu Phosgen. Mono- und dihalogeniertes Methan bildet im Vergleich zu dreifach halogeniertem Chloroform nur schwach zelltoxische Metabolite.

Eine mechanistische Beschreibung der vorgestellten P450-Reaktionstypen findet sich in dem Übersichtsartikel von Koymans et al., in *Xenobiotica*, (1993) 23(6):633.

30 In vivo / in vitro Nutzung von P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese

Im Gegensatz zur mikrobiellen Biotransformation beschränkt sich die Verwendung rekombinant exprimierter P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese trotz enormer Potentiale auf wenige *in vivo* Verfahren wie die Herstellung von Dicarbonsäure als Zwischenstufen für Geruchsstoffe, Steroiden wie Progesteron und subterminal hydroxylierter gesättigter und ungesättigter

Fettsäuren als Vorstufen für Riechstoffe (Laktone), Polymere und Darreichungsformen für Medikamente.

Die Verwendung von P450-Monooxygenasen in vitro zur
 5 Feinchemikaliensynthese ist bisher noch nicht literaturbekannt.
 Um P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese zu verwenden,
 müssen Expressionssysteme vorhanden sein, die es erlauben,
 funktionell aktives P450 über Artgrenzen hinweg in hohen
 Ausbeuten zu exprimieren. Ferner muß das Enzym eine ausreichend
 10 hohe Aktivität und Stabilität (Temperaturstabilität,
 Lösungsmittelstabilität, Oxidationsstabilität) besitzen. Die
 produzierten Metabolite sollten für das Protein und den Wirt
 nicht toxisch sein. Für Klasse I und Klasse II sollte ferner ein
 geeignetes Cofaktor-Recyclingsystem vorhanden sein. Die
 15 vorliegende Erfindung schafft hierzu die Voraussetzungen.

Das P450 BM-3 Monooxygenasesystem

P450 BM-3 (CYP102) wurde erstmals im Jahre 1986 als dritte P450-
 20 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* in *E. coli* funktionell
 aktiv exprimiert und charakterisiert. Mit einem Molekulargewicht
 von 118 kDa war P450 BM-3 das erste bekannte wasserlösliche
 natürliche Fusionsprotein, das alle drei Domänen (FAD, FMN, P450)
 in einer einzigen Polypeptidkette enthält. Im Jahre 1993 gelang
 es, die P450-Domäne ohne Substrate (Ravichandran et al., Science
 (1993) 261, 731) und im Jahre 1997 mit Substrat (Li et al. Nature
 Structural Biology (1997), 4(2): 140) zu kristallisieren. P450
 BM-3 dient aufgrund seiner Sequenzhomologie zu eukaryontischen
 P450 und mangels eukaryontischer P450-Kristallstrukturen als
 30 bevorzugtes Strukturmodell für diese P450-Enzyme.

P450 BM-3 ist eine Fettsäurehydroxylase, die Carbonsäuren,
 Alkohole, Amide, Alkylammoniumverbindungen ab Kettenlänge C12 bis
 zu C22 subterminal hydroxyliert. Die Regiospezifität der
 35 Hydroxylierung hängt, wie in Tabelle 2 gezeigt, stark von der
 Kettenlänge der Fettsäure ab.

Tabelle 2

	Substrate	ω -Hydroxylierung [%]	ω -1 Hydroxylierung [%]	ω -2 Hydroxylierung [%]	ω -3 Hydroxylierung [%]
5	Laurinsäure (12:0)	-	48	26	26
	Myristinsäure (14:0)	-	58	21	21
10	Palmitinsäure (16:0)	-	20	48	31

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren und die folgenden Ausführungsbeispiele, welche die Anwendung des erfindungsgemäßen Donorsystems auf die Hydroxylierung von Fettsäuren mit Hilfe von P450 Enzymen betreffen, näher erläutert. Dabei zeigt

- Figur 1 das P450 BM3-Klonierungsschema am Beispiel von pCYTEXP1;
- Figur 2 das Prinzip des erfindungsgemäßen spektroskopischen P450-Nachweises;
- Figur 3 das Absorptionsspektrum für die Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat mit Zn-Pulver in Tris/HCl, 0,2 M, pH 8,2; gepunktete Linie Co(III)sepulchrat oxidiert; durchgezogenen Linie Zn/Co(III)sepulchrat reduziert;
- Figur 4 die Absorptionsänderung bei Umsatz von 12-pNCA durch P450 BM-3 F87A mit Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M KCl;
- Figur 5 eine Skizze des Elektronentransferwegs von Zn/Co(III)sepulchrat auf P450 mit "shunt"-Reaktionsweg und pNCA als Substrat;

- Figur 6 den Umsatz von 12-PCA durch P450 BM-3 F87A und
 Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M
 KCl mit und ohne Zugabe von Katalase;
- 5 Figur 7 ~~den Einfluß der~~ Tris/HCl- und Kaliumphosphat-
 Puffermischung auf die ~~reduktion von~~ p-Nitrophenolat in
 Gegenwart von P450 BM-3 F87A und Zn/Co(III)sepulchrat;
- 10 Figur 8 (A) 12-pNCA Umsatz durch P450 BM-3 F87A als Funktion
 der Co(III)sepulchrat-Konzentration; (B) den Einfluß
 von Co(III)sepulchrat auf die Aktivität von P450 BM-3
 F87A in Gegenwart von Substrat;
- 15 Figur 9 ~~den 12-pNCA Umsatz als Funktion der eingesetzten~~
 Zinkpulvermenge in Gegenwart von 0,5 mM
 ~~Co(III)sepulchrat;~~
- 20 Figur 10 die P450 BM-3 F87A Restaktivität nach 5 min Inkubation
 bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen
 ohne Substrat.

Referenzbeispiel 1: Mikrobiologische Methoden

5

1. Mikroorganismen und Plasmide, Chemikalien und Enzyme

Das Bakterium *Bacillus megaterium* wurde bei DSMZ-Stammsammlung (32^T, Braunschweig, Deutschland), die *E.coli*-Stämme DH5 α , JM105
 10 und JM109 bei Clontech (Heidelberg, Deutschland) und XL1-Blue bei Stratagene (Heidelberg, Deutschland) erworben. Den Stamm W3110 erhielten wir vom Institut für Bioverfahrenstechnik (Stuttgart, Deutschland). Der *E.coli*-Stamm DH5 α (supE44, lacU169 [80lacZ M15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)
 15 wurde, sofern nicht anders erwähnt, für die folgenden beschriebenen Klonierungsarbeiten verwendet. Als Plasmide fanden pCYTEXP1 mit dem temperaturindizierbaren P_RP_L-Promotorsystem des Bakteriophagen λ (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26:147) und pASK-IBA1CA mit Tetrazyklin-Promotor
 20 (Schmidt, T.G.M., et al., J. Chromatogr. A (1994) 676:337; Schmidt, T.G.M. et al., J.Mol.Biol. (1996) 255:753) Verwendung. Die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression von P450 BM-3 verwendeten Stämme und Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst, wobei pT die Herkunft der P450 BM-3 Konstrukte vom pCYTEXP1-Plasmid und pA die Herkunft vom pASK-1BA1CA-Plasmid kennzeichnet.

Tabelle 3

E.coli-Stamm/Plasmid-Insert-Konstrukt	exprimiertes Protein
DH5 α /pT-USC0BM3, W3110/pT-USC0BM3	P450 BM-3
5 DH5 α /pT-USC1BM3, JM105/pT-USC1BM3, JM109/pT-USC1BM3, W3110/pT-USC1BM3	P450 BM-3His ₆
10 DH5 α /pT-USC1BM3F87A, JM105/pT-USC1BM3F87A, JM109/pT-USC1BM3F87A, W3110/pT-USC1BM3F87A XL1-Blue/pT-USC1BM3F87A	P450 BM-3His ₆ F87A Mutante
10 DH5 α /pT-USC2BM3, W3110/pT-USC2BM3	P450 BM-3Glu ₆
DH5 α /pT-USC3BM3, W3110/pT-USC3MB3	P450 BM-3Arg ₆
DH5 α /pA-USC4BM3, JM105/pA-USC4BM3, JM109/pA-USC4BM3, W3110/pA-USC4BM3	P450 BM-3Strep

15

Sofern nichts anderes erwähnt ist, wurden alle Chemikalien von Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) und alle Enzyme von New England Biolabs (Beverly, USA) oder Boehringer Mannheim (Penzberg, Deutschland) bezogen.

20

2. Kulturmedien

Alle Komplexmedien stammen von Difco (Augsburg, Deutschland).

a) Nutrient-Medium (Vollmedium für *Bacillus megaterium*)

Peptone	5,0 g
Bacto beef	3,0 g
Bacto peptone	5,0 g
Agar	15 g (nur für Plattenkultur)
MnSO ₄ *H ₂ O	10 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

30

Glycerinkultur

Glycerin (86 %)	500 μ l
Kultur (OD ₅₇₈ := 1,0)	500 μ l

35

b) Luria-Bertani-Amp (LB-Amp, Vollmedium für *E. coli*)

Tryptone	10,0 g
NaCl	5,0 g

40

Yeast extract	5,0 g
Agar	20,0 g (nur für Plattenkultur)
Ampicillin	100 g/ml
H ₂ O	ad 1000 ml

5

3. Kultivierung der *E. coli*-Stämme und von *Bacillus megaterium*

10 a) Schüttelkolbenversuche

Die Kultivierung von *Bacillus megaterium* erfolgte im Nutrient-Medium bei 30°C, die rekombinanten *E. coli*-Stämme (DH5α, JM105, JM109, XL1-Blue, W3110) wurden in LB-Amp Medium bei 37°C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei 30°C (*Bacillus megaterium*) und 37°C (*E. coli*) bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in *E. coli* erfolgte nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42°C im Falles der pT-Plasmid-Konstrukte oder durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 0,4 mg/l) beim pA-USC4BM3-Plasmid und einer 14 stündigen Inkubation bei 30°C.

b) 30-l-Batch-Fermentationen

Zur präparativen P450 BM-3 Produktion wurde die Expressionskassette pT-USC1BM3, der Wirt DH5α und ein Bioengineering Fermenter Typ LP351 bei einer Belüftung von 3,5 l/min, einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm bei 37°C in LB-Amp-Medium bei einem Start-pH-Wert von 7,5 eingesetzt. Um Schaumbildung zu vermeiden und Ausbeuten zu steigern wurden 2,0 ml steriles Contraspum 210 (ZSchimmer & Schwarz, Lahnstein, Deutschland) und 0,1 mg/l FeCl₃ vor Inokulation dem LB-Amp-Medium zugegeben (Nishihara et al. 1997). Inokuliert wurde durch Zugabe zweier 400 ml Schüttelkolben-Kulturen (OD₅₇₈ := 0,8-1,0; Abschnitt a)).

Nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes von 1,0 im Fermenter erfolgte die P450-Produktion mittels Hitzeschockinduktion durch Erhöhen der Temperatur für drei bis fünf Stunden von 37°C auf 42°C. P450^{BM-3} oder die Mutante E87A wurden in *E. coli* DH5α in Ausbeuten von 36 bis 48 mg/l Fermenterbrühe exprimiert. Die Aufkonzentrierung der *E. coli*-Kultur von 30 Liter auf 2 Liter wurde durch Querstromfiltration mit einer Millipore Applikation (Eschborn, Deutschland) mit einer Filtron (Dreieich, Deutschland) Centrasette OMEGA (0.3 µm) Membran durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 9200 g für 20 min wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) oder Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) resuspendiert, in zwölf 50 ml Falcon-Tubes (Greiner) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Referenzbeispiel 2: Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von ARK Scientific GmbH Biosystems (Düsseldorf, Deutschland) hergestellt. Nur die Primer für die Punktmutation und für die Isolierung des P450^{BM-3} Gens aus der genomischen *Bacillus megaterium* DNA waren HPLC gereinigt.

a) Oligonukleotide für genomische *Bacillus megaterium*-DNA

B1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 B2) 5'-GCCTCTTGGATCCTTACCCAGCCCACACGTCTTTGCG-3'

b) Primer für Sequenzierung

R0_5 5'-GTACGTGATTTTGCAGGAG-3'
 R1 5'-GGCTATCATGCGATGATGGT-3'
 R1_5 5'-CCCAGCTTATGATGAAAAC-3'
 R2 5'-GGAAAAGATCCAGAAACGGG-3'
 R2_5 5'-GTCCGCATGGTCTTAAACG-3'
 R3 5'-ATTCTCAGCTTCACCGTGA-3'
 R3_5 5'-CTTGGCGGTATTCCTTCAC-3'
 R4 5'-ATTTGCACCGCAGGTGCGAA-3'
 R4_5 5'-CTGGGCTACTACGTATC-3'
 R5 5'-TTCAATTTGTGACAGCGCC-3'
 R5_5 5'-GAAGGAGATCATTTAGGTG-3'
 R6 5'-TCGCGCAATGGCTGCTAAAA-3'
 R6_5 5'-CGATTTCTTCATCACCTC-3'
 R7 5'-CTGCCAAAAGACCCTGAAAC-3'
 L1 5'-ACCATCATCGCATGATAGCC-3'
 L2 5'-CCCGTTTCTGGATCTTTTCC-3'

L3 5'-TCACGGTGAAGCTGAGGAAT-3'
 L4 5'-TTGCGACCTGCGGTGCAAAT-3'
 L5 5'-GGCGCTGTCGACAAATTGAA-3'
 L6 5'-TTTTAGCAGCCATTGCGCGA-3'
 5 L7 5'-GTTTCAGGGTCTTTTGGCAG-3'

c) Oligonukleotide für Tags am C-Terminus

10 A1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 A2) 5'-CGGAATTCTTAACGACGACGACGACGCCAGCCCACACG-3'
 G1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 G2) 5'-CGGAATTCTTATTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCCCACACG-3'
 H1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 H2) 5'-CGCAATTCTTAATGATGATGATGATGATGCCAGCCCACACG-3'
 15 S1) 5'-GTCTCAGCGTGAGACCCCCAGCCCACACGTCTTTTGCC-3'
 S2) 5'-GTGAAAGAGGTCTCCAATGACAATTAAAGAAATGCC-3'

d) Primer für P450 BM-3 Punktmutante F87A

F87A1 5'-GCAGGAGACGGGTGGCCACAAGCTGGACGCATG-3'
 F87A2 5'-CATGCGTCCAGCTTGTGGCCAACCCGTCTCCTGC-3'

Referenzbeispiel 3: Gentechnische Methoden

25

1. Isolierung und Präzipitation genomischer *Bacillus*-DNA und Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation der genomischen DNA aus *Bacillus megaterium*
 30 mittels Phenol-Chloroformextraktion wurde das Zellpellet aus
 200 ml Kulturüberstand ($OD_{578} = 1,2$) in 20 ml Lysozymmix (18 mg
 Lysozym, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, pH 8,0)
 resuspendiert und bei 37°C und 30 Minuten lang bei 220 UpM
 geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml SDS (10 % (m/v)) wurde
 35 weitere 60 Minuten bei 37°C und 220 UpM inkubiert. Zur
 Entfernung von Zelltrümmern wurde dreimal mit einer Mischung
 aus Chloroform/Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 und einmal mit Phenol extrahiert. Die genomische DNA wird durch
 Zugabe von 10 % (v/v) 3 M NaAc, pH 4,8 und 60 % (v/v)
 40 Isopropanol gefällt, mittels Glasstab aufgerollt, in ein Corex-
 Röhrchen überführt und bei 32 570 g zentrifugiert. Nach
 dreimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wird die DNA am
 "Hausvakuum" getrocknet und in 3 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl,
 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Die Reinheit der DNA wurde
 45 spektroskopisch durch Quotientenbildung von 260 nm zu 280 nm zu

2,2 bestimmt.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem auf alkalischer Lyse der Zellen basierenden QIAprep Spin-Miniprep-Kit exakt nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

a) PCR-Reaktion zur Isolierung des P450 BM-3 Gens aus genomischer *Bacillus megaterium*-DNA

PCR-Standardprotokoll

Wiederholungen des Programmschritts	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 Mal	95°C, 7 min		
30 Mal	95°C, 1,5 min	50°C, 1,5 min	72°C, 2 min
1 Mal			72°C, 7 min

Standard-Ansatz

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Tag-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl₂, 8µl MgCl₂ (25mM), 1 µl Primer B1 (0,1 µM), 1 µl Primer B2 (0,1 µM), 1µl genomische *Bacillus megaterium*-DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

b) Einfügen von Tag-Sequenzen am C-Terminus

Um die Proteinreinigung zu vereinfachen und eine gerichtete Immobilisierung von P450 BM-3 zu ermöglichen wurde ein jeweils sechs Aminosäuren langer C-terminaler-Tag an das P450 BM-3 Gen angefügt. Als Templat fungierte genomische *Bacillus megaterium*-DNA. Als überhängende Restriktionsenden wurden für die His-, Arg- und Glu-Tags BamHI und EcoRI gewählt, um

anschließend die modifizierten P450-BM-3-Gene in das Plasmid pCYTEXP1 zu klonieren. Für den Strep-Tag wurden für das 5'- und 3'-Ende *BsaI* gewählt; dies ermöglicht eine Klonierung in das Plasmid pASK-IBA1CA. *BsaI* schneidet erst nach der

5 Erkennungssequenz, wodurch die überhängenden Restriktionsenden eine unterschiedliche Sequenz aufweisen und somit eine gerichtete Ligation erlauben.

Für die PCR-Reaktionen wurden das Standard-PCR Programm und der

10 Standard-Ansatz verwendet. Im Unterschied zum Standard-Ansatz wurden für den His₆-Tag die Primer H1 und H2, für den Arg₆-Tag die Primer A1 und A2, für den Glu₆-Tag die Primer G1 und G2 sowie für den Strep-Tag die Primer S1 und S2 verwendet.

15 3. Restriktionsspaltung, Elektrophoretische Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch. Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen

20 von 10 µl in Gegenwart von 2-3 µl nach DNA (Spin-Präp (Qiagen)), 1-2 U Restriktionsenzym, 1 µl Restriktionspuffer (10x) und ad 10 µl ddH₂O durch ein- bis zweistündige Inkubation der Reaktionslösung bei 37°C (außer *BsaI*) entsprechend der Herstellervorschrift. Die Reinigung der DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Vorschrift von (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Als Elektrophorese-Puffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Angelegt wurde

~~30 aufgrund der Wärmeentwicklung bei bis zu einprozentigen~~

Agarose-Gelen eine Spannung von 120 V und bei bis zu zweiprozentigen Agarose-Gelen von 100 V. Interkalierendes Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25µM) wurde zur Visualisierung der DNA im UV-Durchlicht eines Transilluminators

35 (312 nm) verwendet.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen)

durchgeführt. Dabei wird die DNA durch Binden an eine Silika-Gel enthaltene Säule immobilisiert und mittels verschiedener Waschschriffe von Verunreinigungen befreit. Durch anschließende Elution mit ~~demineralisiertem Wasser~~ können mit dieser Methode
 5 bis zu 8 μg DNA (100-bp-10-kb) erhalten werden.

4. Ligation und Transformation in *E. coli*

Zur Ligation von DNA wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet, die die Bildung von
 10 Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden der DNA katalysiert und somit zwei lineare DNA-Moleküle verbindet oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls ermöglicht.

15 Zur Ligation wurden Agarose-Gel gereinigte Vektor- und Insertfragmente ~~(vergleiche Punkt 3.)~~ im molaren Verhältnis 1 zu 3 bis 1 zu 5 ~~zugunsten des Inserts~~ in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. ~~Vor Zugabe von 2 μl Ligase-Puffer (10x)~~
 20 und 2-10 U T4-DNA-Ligase wurde ~~demineralisiertes~~ Wasser hinzugefügt (Gesamtvolumen 20 μl). Die Reaktionsansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 7°C inkubiert.

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation wurden 500 μl einer *E. coli*-Übernachtskultur zum Animpfen eines 250 ml-Schüttelkolbens, der 50 ml LB-Medium enthielt, verwendet. Nach ca. dreistündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM, wird die Kultur nach Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes zwischen
 30 0,4-0,6 bei 5500 g 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml TSS-Puffer (10 g PEG6000, 5 ml DMSO, 0,6 g MgSO₄, ad 100 ml LB) resuspendiert, auf Eis inkubiert und in 200 μl Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

35

Zur Transformation werden zu 200 μl der kompetenten Zellen 5 bis 15 μl des Ligationsansatzes gegeben. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz 30 s bei 42°C

im Thermomixer inkubiert und 800 μ l auf 37°C erwärmtes LB-Medium zugegeben. Die Ansätze werden eine Stunde lang im Inkubator bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 5500 g zentrifugiert (3 Minuten), im rücklaufenden Tropfen
 5 LB-Medium aufgenommen und auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

5. DNA-Sequenzierung

10

Die DNA-Sequenzierung wurde unter Verwendung des Applied Biosystems DNA Sequenzierautomats 373A und des Dye Terminator Cycle Sequencing-Kits mit AmpliTaq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode von Sanger,
 15 jedoch werden statt radioaktiv markierter dNTPs, dNTPs mit Fluoreszenzmarkern eingesetzt, die im Verlauf der Sequenzierungsreaktion in die synthetisierten DNA-Fragmente eingebaut werden.

20

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 100 prozentigem auf -20°C gekühltem Ethanol gefällt. Nach Trocknung der DNA und Aufnahme in 4 μ l einer 5:1-Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8,0 erfolgte die Denaturierung eines jeden PCR-Ansatzes bei 95°C für 5 Minuten und sofortiger Überführung der Proben auf Eis.

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Fragmente durchlaufen während der Gelelektrophorese einen Laserstrahl. Das senkrecht zu diesem Strahl emittierte Fluoreszenzlicht wird
 30 von Fotodioden hinter dem Gel gemessen und von der Software in ein Kurvendiagramm umgewandelt.

Sequenzier-Ansatz

8 μ l Terminator Ready Reaction Mix; 3,2 pmol Primer; 300-500 ng
 35 Template DNA;
 H₂O ad 20 μ l.

PCR-Programm

	Wiederholungen des Programm- schritts	Denaturier- ung	DNA- Annealing	Elongation/ DNA- Synthese
5	1 Mal	96°C, 6 min		
	25 Mal	96°C, 40 s	50°C, 30 s	60°C, 4 min
10	1 Mal			60°C, 4 min

Sequenzier-Gel-Zusammensetzung:

Harnstoff 30 g (Roth); Rotiphorese NF-10x-TBE-Puffer 6 ml
 15 (Roth); Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (29:1) 9 ml (Roth); ddH₂O
 demineralisiert 23,5 ml.

Die fertige Lösung wird filtriert und entgast. Die
 Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10
 20 % (m/v) APS gestartet. Für Einzelheiten dazu, zur Auswertung
 der Sequenzdaten und zu den dNTP-Markierungen, sei auf das
 Handbuch zum Sequenzierautomaten verwiesen.

6. Punktmutation F87A mittels QuikChange Kit (Stratagene)

25 Zur Erhöhung der Sensitivität des pNCA-Assaysystems, wurde an
 Position 87 die Aminosäure Phenylalanin durch ein Alanin
 ersetzt. Um die Punktmutante leichter identifizieren zu können,
 wurde, ohne weitere Änderung der Aminosäuresequenz, eine
 30 zusätzliche *EaeI*-Restriktionsschnittstelle unter Einbeziehung
 der Mutationsposition, eingefügt.

Im Gegensatz zum Standard-PCR-Programm erfolgte hierbei nur
 eine vierminütige DNA-Denaturierung und der

35 Sequenzierreaktionsschritt wurde bei einer Annealing-Temperatur
 von 52,3°C, und 17minütigem Elongationsschritt nur 16 Mal
 durchlaufen. Auf den dritten Programmschritt wurde verzichtet.

Ansatz für PCR:

40 1,2 µl dNTP-Mix (200µM), 5 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5
 U Pfu-Polymerase, 2,5 µl Primer F87A1 (5nM), 2,5 µl Primer

F87A2 (5nM), 1 μ l pT-USC1BM3 (aus Mini-Präparation 1:20 mit demineralisiertem Wasser verdünnt), ad 50 μ l demineralisiertes Wasser.

- 5 Die "Annealing"-Temperatur von 52,3°C zeigte nach obiger PCR-Reaktion auf einem einprozentigen Agarose-Gel eine scharfe Bande mit erwarteter Fragmentgröße.

- 10 Nach Abtrennen des Mineralöls vom Reaktionsgemisch wurde der PCR-Ansatz mit 1 μ l *DpnI* (10 U/ μ l) versetzt und die Lösung vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es wurde kurz zentrifugiert und inkubiert bei 37°C für eine Stunde. Während des Verdaus wurden die ultrakompetenten *E. coli* XL1-Blue auf Eis aufgetaut und in 50 μ l Aliquots auf 15 ml Falcon-Tubes
- 15 verteilt. Nach Zugabe von 1 μ l β -Mercaptoethanol, 4 μ l Zugabe des verdauten PCR-Reaktionsansatzes und 30minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 30 s langer Hitzeschock bei 42°C und eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Zum Transformationsansatz wurden 450 μ l erwärmtes (Ölbadtemperatur 42°C) NZY-Medium (12
- 20 g NZamine, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,5) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM und Zentrifugation (5500 g, 3 min) wurde das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

Referenzbeispiel 4: Präparative Methoden

1. Zellaufschluß

- 30 Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g *E. coli* DH5a/pT-USC1BM-3 oder DH5a/pT-USC1BM-3F87A wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland),
- 35 Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 μ m Sterivex-GP-Filter

(Millipore) filtriert. Diese klare Lösung wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

5 2. Chromatographische P450 BM-3 Reinigungsmittels
 Anionenaustauschern

10 Zur Proteinreinigung wurde ein ÄKTAexplorer System (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer auf Personal-Computern basierenden OS/2-UNICORN Steuersoftware v2.1 und einem Frac-900 Fraktionssammler verwendet, das die gleichzeitige Messung der Gesamtproteinelution bei 280 nm und P450 BM-3 Elution bei 417 nm erlaubt.

15 Alle analytischen P450 BM-3 Proteinreinigungen mittels Anionenaustauscherchromatographie wurden bei 200 cm/h, Raumtemperatur und einer Beladung von 6-10 mg P450 BM-3 pro 100 ml Matrix durchgeführt. Alle Chromatographiematerialien wurden von Tosoh Haas (Stuttgart, Deutschland) bezogen.

20

a) Packung und Charakterisierung der Chromatographiesäulen

Zur Entwicklung eines P450 BM-3 Reinigungsprotokolls wurden vom Hersteller gepackte MPD-DEAE 650S (7,5 mm x 85 mm, Partikeldurchmesser 35 µm, Af=1,1, 4100 TP/m) und selbst gepackte XK16/20 (16 mm x 100 mm, APB) Chromatographiesäulen verwendet, die Toyopearl DEAE 650M (Af= 1,1, 1610 Tp/m), SuperQ 650M, (Af= 1,2, 1840 Tp/m) und QAE 550M (Af= 1,0, 1780 Tp/m) mit einem Partikeldurchmesser von 65 µm enthielten.

30 Für die präparativen Chromatographiereinigungen wurde eine INDEX200 (APB) Glassäule (20 cm x 19 cm, Af= 1,4, 3800 Tp/m), sechs Liter Toyopearl DEAE 650M und eine Zahnradpumpe (ISMATEC, PB, USA) benutzt. Im Gegensatz zu den analytischen P450 BM-3 Chromatographiereinigungen wurde das ÄKTAexplorer System über
 35 einen 1/20 aufgeteilten Fluß als Monitor verwendet, und die Puffer vor den präparativen Reinigungen manuell hergestellt. Die Puffer bestanden aus Tris/HCl (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA sowie 150 mM NaCl für die erste, 250 mM NaCl für die zweite und

1 M NaCl für die dritte Salzstufe.

b) Wahl der pH-, Elutions- und Pufferbedingungen

5 Voruntersuchungen auf der Grundlage von Aktivitätsmessungen über NADPH-Verbrauch ergaben einen geeigneten pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 zur P450 BM-3 Reinigung. Spätere Untersuchungen zur pH-Stabilität mit dem pNCA-Nachweissystem bestätigten diesen pH-Bereich.

10 Anionenaustauscherchromatographien mit linearen NaCl-Gradienten zeigten, daß ein Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA einem Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0 bis pH 7,5) mit 1 mM EDTA in Bezug auf Bindungskapazität und Auflösungsvermögen für P450
15 BM-3 deutlich überlegen ist. Aus diesen Gründen wurde das Tris/HCl-Puffersystem für alle weiteren Reinigungsoptimierungen verwendet.

20 3. Immobilisierung der P450 BM-3 F87A Mutante

a) Vorexperimente zur Auswahl der Trägermaterialien

Zur Immobilisierung von P450 BM-3 F87A wurden in Vorexperimenten verschiedene adsorptive und kovalente Methoden untersucht. Für alle Vorexperimente wurden 100 mg Trägermaterial (Ausnahme: EP-100, 50 mg) und 5 nmol P450 BM-3 F87A (aus Rohextrakt) verwendet.

30 Zur Auswahl eines geeigneten Trägermaterials wurde bei den adsorptiven Methoden 5 nmol P450 BM-3 F87A zur K_xPO_4 -Puffer-(20 mM, pH 7,5, ad 1600 μ l) Trägermaterial-Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nach Anbringen mittels Klebeband an die Außenseite eines 250 ml
35 Rundkolbens eine Stunde am Rotationsverdampfer langsam zur Proteinimmobilisation über Kopf gedreht. Zur Bestimmung der Adsorptionskapazitäten wurden die Immobilisate eine Minute bei 9000 g zentrifugiert und 200 μ l des Überstandes zur

Aktivitätsmessung entnommen.

b) Optimierte Immobilisierungsvorschrift für DEAE 650M und Super Q650M

5

Bis zu 81 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts oder Lyophilisats können pro ml sedimentiertem DEAE 650M Adsorptionsmaterial in 5 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,5)

10

sind es bis zu 102 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts. Zur Immobilisierung wurde das Lyophilisat in 4 ml dH₂O in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 0,1 mM 12-pNCA versetzt. Nach

15

5 ml Wasser zweimal gewaschenen und zentrifugierten (9000 g, 1 min) Adsorptionsmatrix zugegeben und eine halbe Stunde analog zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen über Kopf gedreht. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Immobilisat mit 5 ml

20

Tris/HCl-Puffer (pH 7,5, 0,02 mM) versetzt, vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (9000 g, 1 min). Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach Zugabe von Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) auf ein Endvolumen von 2,0 ml zum Immobilisat wurde dieses resuspendiert und in 200 µl Aliquots auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die bereits 495 µl dieses Puffers enthielten. Nach Zugabe von 5 µl 12-pNCA (15 mM) und fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion in einer Eppendorf-Schüttelapparatur (Ika-Vibrax, mit Janke und Kunkel Aufsatz VX2E) durch Zugabe von 100 µl NADPH (1 mM) gestartet und nach variierten Reaktionszeiten mit 100 µl 6 M KOH gestoppt. Nach Zentrifugation bei 9000 g (1 min) wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm bestimmt.

30

35 Zur kovalenten Immobilisierung von P450 BM-3 F87A mittels Glutardialdehyd wurde P450 BM-3 F87A in einem 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgeschlossen. 5 g aminomodifizierter Trisopor-Gläser (Schueller, i 500-800 µm)

wurden bei Raumtemperatur zwischen drei und zwölf Stunden in einer geschlossenen Apparatur mit Glutardialdehyd bedampft. Die mit Glutardialdehyd aminomodifizierten Gläser zeigten eine rot-violette Farbe, die auch nach zweimaligem Waschen mit 100 ml Kaliumcarbonatlösung (50 mM, pH 7,8) über eine Fritte erhalten bleibt. Zwischen 50-150 mg dieser rot-violetten Gläser wurden mit 0,5-0,8 nmol P450 BM-3 F87A versetzt und bis zur Entfärbung der Lösung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Retsch-Kugelmühle bei niedrigster Stufe und 6°C eine Stunde lang geschüttelt.

4. Enzym-Membranreaktor

Zur Überprüfung des Enzym-Membran-Reaktorkonzepts wurden 25 nmol P450 BM-3 F87A auf 4 ml SuperQ 650M immobilisiert und in das Reaktorreaktionsgefäß zu 200 ml Tris/HCl Puffer (pH 7,8) gegeben. Nach Zugabe von 1,2 µmol 12-pNCA bei einer Flußgeschwindigkeit von 40 ml/min wurde die Lösung 20 Minuten lang ohne Gegendruck auf das Filtrationsmodul durchmischt. Bei einem Gegendruck von 2 psi wurde durch Zugabe von 2 ml wäßriger NADPH-Lösung (1 mM) die Reaktion gestartet und der Reaktionsablauf durch die Bestimmung der Wellenlängen bei 410 nm verfolgt. Während des Reaktionsablaufs wurde NADPH-Lösung in 1 ml Schritten bis zur vollständigen 12-pNCA-Umsetzung zugegeben.

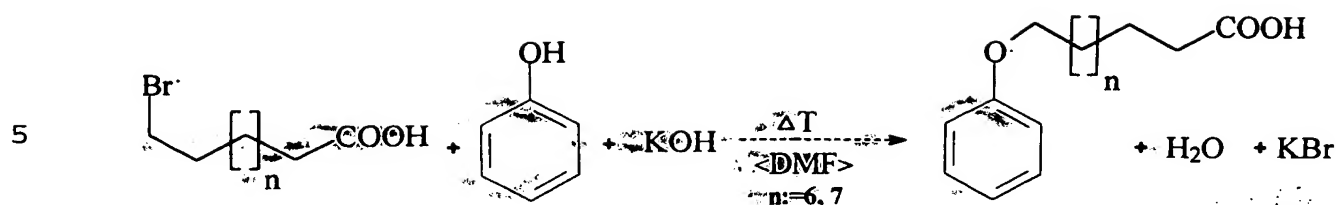
Referenzbeispiel 5: Chemische Synthesen

Alle ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 500 MHz-NMR-Gerät, alle ^{13}C -NMR mit einem 125 MHz-NMR-Gerät und CDCl_3 als Lösungsmittel aufgenommen.

1. Herstellung von ω -Phenoxycarbonsäuren (PCA)

Reaktionsschema A zeigt zur direkten PCA-Synthese aus ω -Bromocarbonsäuren.

Reaktionsschema A



Ansätze

	1,01	g	(3,77 mmol)	Bromundekansäure oder
10	1,05	g	(3,77 mmol)	Bromdodekansäure
	355	mg	(3,77 mmol)	Phenol
	417	mg	(7,44 mmol)	Kaliumhydroxid
	50	ml		DMF

15

Allgemeine Reaktionsvorschrift

Zur in DMF gelösten Bromfettsäure gibt man Phenol und Kaliumhydroxid. Die Lösung wurde unter Rückfluß 6-7 Stunden lang auf 160°C erhitzt, und die Reaktion mittels

- 20 Dünnschichtchromatographie (DC, Laufmittel: Petrolether : Diethylether 1:1) verfolgt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der braune Niederschlag in einem Wasser-Diethylether-Zweiphasensystem (1:1) gelöst und mit verdünnter Salzsäure wurde ein pH-Wert von 2 eingestellt. Nach Extraktion der wäßrigen Phase mit Diethylether wurden am Rotationsverdampfer die vereinigten Diethyletherfraktionen vom Lösungsmittel befreit, in Petrolether:Essig-säureethylester 1:1 aufgenommen und mittels einer DC60-Kieselgelchromatographiesäule (Merck) und dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt.

30

Charakterisierung:

- ω-Phenoxydodekansäure (12-PCA): Ausbeute: 76 %; m_p : = 98-99°C
 35 berechnet: C 73,93% H 9,65% O 16,41%, gefunden: C 73,92% H 9,67%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 7,26-7,29 (m, 2H, Phenyl-), 6,88-6,94 (m, 3H, Phenyl), 3,94 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -

CH₂-COO, J= 7,5 Hz), 1,74-1,80 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,59-1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,42-1,48 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,29-1,35 (m, 12 H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

¹³C-NMR: δ:= 180,4 (-COO), 159,3 (C-1'), 129,8 (C-3'), 120,8 (C-4'), 114,7 (C-2'), 68,3 (-O-CH₂-), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,7, 29,5, 29,4, 29,1, 26,5, 25,1 (C-3-C-11).

ω-Phenoxyundekansäure (11-PCA): Ausbeute: 78 %; m_p:= 95°C
berechnet: C 73,35% H 9,41% O 17,24%, gefunden: C 73,32% H 9,44%

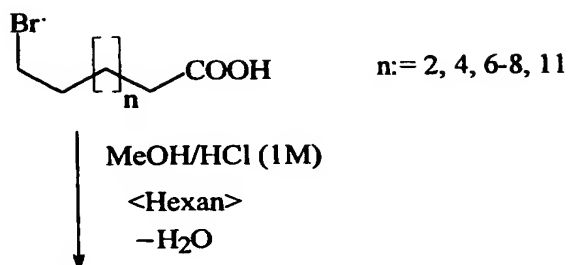
¹H-NMR: δ:= 7,18-7,21 (m, 2H, Phenyl-), 6,81-6,86 (m, 3H, Phenyl), 3,87 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,5 Hz), 2,27 (t, 2H, -CH₂-COO, J= 7,5 Hz), 1,67-1,73 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,53-1,57 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35-1,39 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18-1,30 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

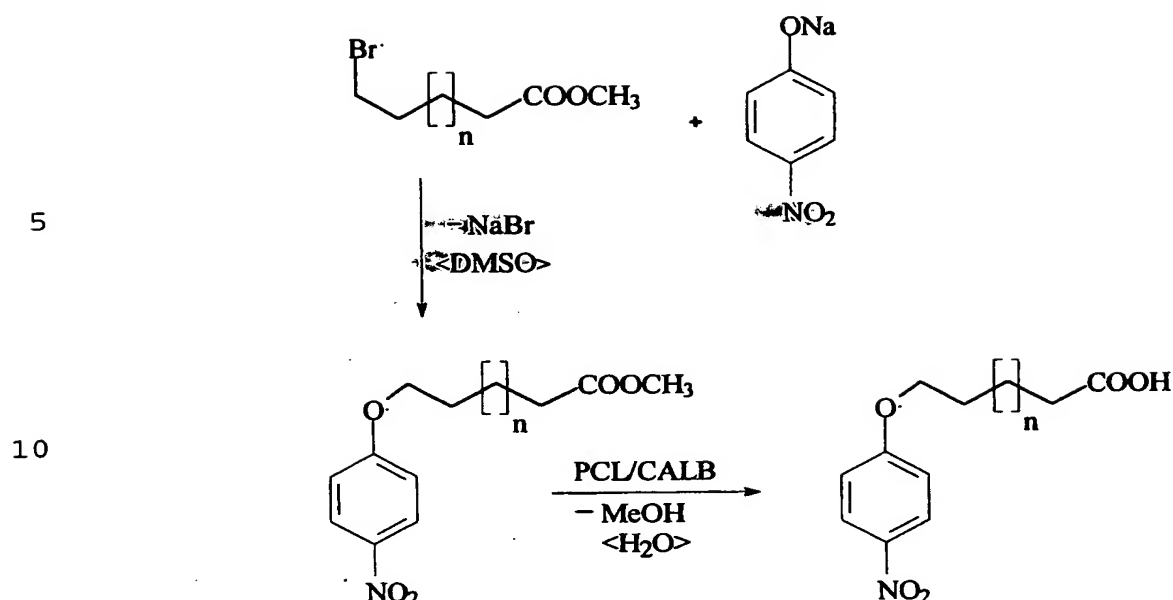
¹³C-NMR: δ:= 180,5 (-COO), 159,5 (C-1'), 129,8 (C-3'), 120,7 (C-4'), 114,7 (C-2'), 68,2 (-O-CH₂-), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,7, 29,7, 29,7, 29,6, 29,4, 26,4, 25,0 (C-3-C-10).

2. Herstellung von p-Nitrophenoxycarbonsäuren (pNCA)

Im Gegensatz zu den PCA-Synthesen war eine entsprechende Synthese der pNCA-Verbindungen nicht möglich. Die pNCA-Synthese gelang erst, nachdem die ω-Bromcarbonsäuren verestert waren und wasserfrei gearbeitet wurde.

Reaktionsschema B





15 Allgemeine Vorschrift zur Synthese:

Ausgehend von ω -Bromcarbonsäuren, wurden ω -Bromcarbonsäuremethylester und ω -Bromcarbonsäureethylester in Hexan entsprechend einer Standardmethode (Becker, et al. 1993) mit wasserfreier Methanol- oder Ethanollösung, die 1 M HCl enthält, verestert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (Laufmittel Hexan : Diethylether : Essigsäure 70:30:1) verfolgt. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit Diethylether extrahiert, zwei Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Nacht mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und chromatographisch aufgereinigt, wobei als Laufmittel Petrolether : Diethylether im Verhältnis 70:30 verwendet wird. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert war, wurden die Ester eine Stunde lang ans Hochvakuum angeschlossen. Um die p-NCAester darzustellen wurde zu 17 mmol ω -Bromcarbonsäureester, die in 100 ml DMSO gelöst wurden, ein geringer Überschuß von 18,5 nmol p-Nitrophenol gegeben. Die Lösung wurde unter Rückflußkühlung für zwei bis drei Stunden auf 120°C erhitzt. Nach Abkühlen der leicht bräunlichen Lösung auf Raumtemperatur wurde tropfenweise demineralisiertes Wasser zugegeben, um die pNCAester auszufällen. Das Präzipitat wurde filtriert, mit 1,5 Liter

eiskaltem Wasser zur Entfernung von überschüssigem p-Nitrophenol gewaschen und in DMSO zu einem weißen Pulver umkristallisiert. Zur Hydrolyse der pNCAester wurde eine Lipasemischung, bestehend aus 100 mg *Pseudomonas cepacia* (PCL) und 100 mg *Candida antarctica* Lipase B von Amano (Nagoya, Japan), zu einer 100 ml Aceton/Wasser Mischung (pH 7,5, 0,2 M Kaliumphosphat, bis zu 50 % Aceton) zugegeben. Nach Zugabe der pNCAester (5 mmol) wurde die Suspension bei Raumtemperatur bis zu 16 h gerührt. Zur Entfernung des Lipaseimmobilisats wurde die klare Suspension filtriert und die pNCAs durch Evaporierung von Aceton kristallisiert. Die pNCA-Verbindungen wurden mit kaltem Wasser gewaschen, in DMSO umkristallisiert und chromatographisch über Silicagel DC60 (Merck, Darmstadt) (Petrolether : Essigsäureethylester 1:1 bis 1:3) gereinigt.

Charakterisierung der pNCAs

Die angegebenen Ausbeuten der pNCA beziehen sich immer auf die entsprechenden pNCAester als Edukte, und die Ausbeuten für die pNCAester beziehen sich immer auf die zugehörigen ω -Bromcarbonsäuren.

p-Nitrophenoxyhexansäure (6-pNCA): Ausbeute: 81 %; $m_p := 94^\circ\text{C}$
 $^1\text{H-NMR}$: $\delta := 8,18$ (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3\text{Hz}$), $6,94$ (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3\text{ Hz}$), $4,06$ (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,3\text{ Hz}$), $2,42$ (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,1\text{ Hz}$), $1,80$ - $1,92$ (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), $1,68$ - $1,77$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), $1,49$ - $1,61$ (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta := 180,0$ ($-\text{COOH}$), $164,1$ (C-4'), $141,4$ (C-1'), $125,9$ (C-2'), $114,4$ (C-3'), $68,5$ ($-\text{O-CH}_2$ -), $33,9$ ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$), $28,6$, $25,5$, $24,3$ (C-3, C-5, C-4).

p-Nitrophenoxyhexansäureethylester (6-pNCAEt): Ausbeute: 81 %
 $^1\text{H-NMR}$: $\delta := 8,09$ (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3\text{Hz}$), $6,85$ (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3\text{ Hz}$), $4,05$ (q, 2H, $-\text{COO-CH}_2$ -), $3,97$ (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,4\text{ Hz}$), $2,26$ (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,3\text{ Hz}$), $1,69$ - $1,82$ (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), $1,57$ - $1,67$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$),

1,40-1,50 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,17

(t, 3H, -COOCH₂-CH₃).

¹³C-NMR: δ := 173,7 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,0 (C-2'), 114,6 (C-3'), 68,7 (-O-CH₂-), 60,4

5 (-COO-CH₂-), 34,3 (-CH₂-COO-), 28,8, 25,7, 24,8 (C-3, C-5, C-4), 14,4 (-O-CH₂-CH₃).

p-Nitrophenoxyoktansäure (8-pNCA): Ausbeute: 92 %; m_p := 98°C

¹H-NMR: δ := 8,11 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,4 Hz), 2,29 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,4 Hz), 1,69-1,80 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂), 1,56-1,61 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,32-1,43 (m, 6H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₃-CH₂-).

¹³C-NMR: δ := 180,2 (-COOH), 164,3 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,8 (-O-CH₂-), 34,0 (-CH₂-COOH), 28,9, 28,9, 28,9, 25,8, 24,6 (C-3-C-7).

p-Nitrophenoxyoktansäuremethylester (8-pNCAME): Ausbeute: 79 %

¹H-NMR: δ := 8,10 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 3,59 (s, 3H, -COOCH₃), 2,24 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,4 Hz), 1,69-1,77 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,51-1,59 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,27-1,43 (m, 6H, -O-(CH₂)₂-(CH₂)₃-).

¹³C-NMR: δ := 174,2 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,8 (-O-CH₂-), 51,5 (-COO-CH₃), 34,0 (-CH₂-COO-), 29,0, 28,9, 28,9, 25,8, 24,9 (C-3-C-7).

p-Nitrophenoxydekansäure (10-pNCA): Ausbeute: 84 %; m_p := 101°C

¹H-NMR: δ := 8,18 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,93 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,4 Hz), 1,75-1,86 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,60-1,63 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,32-1,45 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

¹³C-NMR: δ := 180,4 (-COO), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,1 (-O-CH₂-), 34,2

(-CH₂-COOH), 29,9, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 26,3, 26,1, 24,8 (C-3-C-9).

p-Nitrophenoxydekansäuremethylester (10-pNCAME): Ausbeute: 73 %

5

¹H-NMR: δ:= 8,11 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J= 9,2 Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,3 Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,5 Hz), 3,59 (s, 3H, -COOCH₃), 2,23 (t, 2H, -CH₂-COO, J= 7,5 Hz), 1,68-1,77 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,52-1,57 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO),
10 1,22-1,45 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

¹³C-NMR: δ:= 174,2 (-COO), 164,2 (C-4'), 141,2 (C-1'), 125,8 (C-2'), 114,3 (C-3'), 68,8 (-O-CH₂-), 51,3 (-COOCH₃), 34,3 (-CH₂-COO-), 29,2, 29,1, 29,1, 29,0, 28,9, 25,8, 24,8 (C-3-C-9).

15 *p*-Nitrophenoxyundekansäure (11-pNCA): Ausbeute: 89 %; m_p:= 102°C

¹H-NMR: δ:= 8,19 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J=9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,1 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J= 7,6 Hz), 1,79-1,84 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-),
20), 1,61-1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,32-1,45 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

¹³C-NMR: δ:= 180,12 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 (-O-CH₂-), 34,0 (-CH₂-COO-), 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,6 (C-3-C-10).

p-Nitrophenoxyundekansäuremethylester (11-pNCAME): Ausbeute: 80 %

¹H-NMR: δ:= 8,18 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J=9,3 Hz), 6,93 (d, 2H, Phenyl-O-, J= 9,2 Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,5 Hz),
30 3,66 (s, 3H, -COOCH₃), 2,29 (t, 2H, -CH₂-COO, J= 7,5 Hz), 1,75-1,86 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,58-1,64 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,29-1,45 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

¹³C-NMR: δ:= 174,5 (-COO), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,0 (-O-CH₂-), 51,6 (-COOCH₃), 34,2 (-CH₂-COO-), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-10).

35

p-Nitrophenoxydodekansäure (12-pNCA): Ausbeute: 89 %; m_p := 106°C

berechnet: C 64,07% H 8,07% N 4,06%, O 23,71%, gefunden: C 63,99% H 8,18% N 4,15%

- 5 $^1\text{H-NMR}$: δ := 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, J = 9,3 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,4 Hz), 4,04 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,6 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO-, J = 7,5 Hz), 1,79-1,84 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,60-1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,29-1,35 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).
- 10 $^{13}\text{C-NMR}$: δ := 180,4 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 (-O-CH₂-), 34,1 (-CH₂-COO-), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-11).

p-Nitrophenoxydodekansäureethylester (12-pNCAEt): Ausbeute: 73 %

- 15 $^1\text{H-NMR}$: δ := 8,18 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 4,12 (q, 2H, -COO-CH₂-, J = 7,1 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,29 (t, 2H, -CH₂-COO-, J = 7,5 Hz), 1,70-1,87 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,59-1,69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,32-1,45 (m, 14H, -O-CH₂-CH₂-(CH₂)₇-CH₂-), 1,26 (t, 3H, -COOCH₂-CH₃, J = 7,2 Hz).
- 20 $^{13}\text{C-NMR}$: δ := 174,8 (-COO), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,0 (-O-CH₂-), 60,5 (-COO-CH₂-), 34,2 (-CH₂-COO-), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-11), 14,4 (-COO-CH₂-CH₃).

p-Nitrophenoxydodekansäure (15-pNCA): Ausbeute: 87 %; m_p := 115°C

- $^1\text{H-NMR}$: δ := 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO-, J = 7,5 Hz), 1,79-1,85 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,59-1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,43-1,49 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,26-1,35 (m, 18H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₂-).
- 30 $^{13}\text{C-NMR}$: δ := 180,0 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 126,0 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 (-O-CH₂-), 34,0 (-CH₂-COO-), 29,6, 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-14).
- 35

p-Nitrophenoxy-pentadecansäuremethylester (15-pNCAME): Ausbeute: 75 %

$^1\text{H-NMR}$: δ := 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J=9,2$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J=9,3$ Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J=6,5$ Hz),
 5 3,66 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 2,26 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J=7,5$ Hz), 1,79-
 1,85 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,59-1,66 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,43-
 1,49 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,26-1,35 (m, 18H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_9\text{-CH}_2\text{-}$).

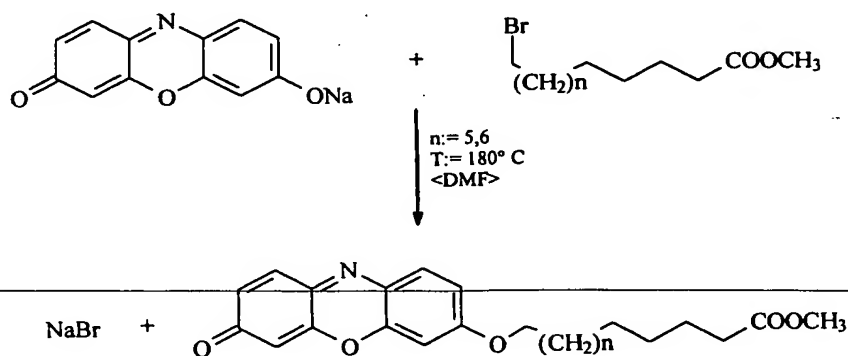
$^{13}\text{C-NMR}$: δ := 174,6 ($-\text{COO}$), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 126,0
 10 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 ($-\text{O-CH}_2\text{-}$), 51,7 ($-\text{COOCH}_3$), 34,0 ($-\text{CH}_2\text{-COO-}$),
 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,1, 26,1, 25,0 (C-3-C-14).

3. Herstellung von Resorufinylcarbonsäuren (RCA)

15

a) Darstellung von ω -Resorufinyl-dodekansäuremethylester und ω -Resorufinyl-undekansäure-methylester

20 Zur RCA-Synthese wurden die ω -Bromcarbonsäuren, entsprechend dem Vorgehen bei den pNCA-Verbindungen verestert, mit dem Natriumresorufinsalz in DMF umgesetzt und mittels einer PCL/CAL- B-Lipasemischung hydrolysiert.



30

Ansatz für ω -Resorufinyl-laurinsäuremethylester:

0,90 g	(3,1 mmol)	12-Bromlaurinsäuremethylester
35 0,72 g	(3,1 mmol)	Resorufin
50 ml		DMF

Ansatz für ω -Resorufinylundekansäuremethylester:

0,75 g	(2,7 mmol)	11-Bromundekansäuremethylester
0,63 g	(2,7 mmol)	Resorufin
50 ml		DMF

5

Durchführung:

Zur Lösung des Bromfettsäureesters in DMF gibt man Resorufin, das sich nicht vollständig löst, zu. Die dunkelviolette

- 10 Suspension wird unter Rückfluß vier Stunden lang erhitzt und die Reaktion mittels DC (Laufmittel Petrolether:Diethylether 1:1) verfolgt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der braune Niederschlag in Petrolether:Essigsäureethylester 1:1 eine halbe Stunde lang gelöst und mittels einer DC60 (Merck)-
- 15 Kieselgelchromatographiesäule in dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt. Die Säule sollte nicht zu groß gewählt werden, da die Verbindung in geringem Maße auf der Säule zerfällt.

- 20 ω -Resorufinyl Laurinsäuremethylester: Ausbeute: 17 %

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 7,62 (d, 1H, -H-9', J= 8,89 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J= 9,79 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', $J_{8',9'}= 8,87$ Hz, $J_{8',6'}= 2,41$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2',1'}= 9,74$ Hz, $J_{2',4'}= 1,74$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J= 2,40 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J= 1,74 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J= 6,50 Hz), 3,59 (s, 3H, -COO-CH₃), 2,23 (t, 2H, -CH₂-COO, J= 7,50 Hz), 1,73-1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,53-1,56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,37-1,41 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,22-1,29 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

- 30 $^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 186,7 (-C-3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 51,9 (-COO-CH₃), 34,5 (-CH₂-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-
- 35 11).

ω -Resorufinylundekansäuremethylester: Ausbeute: 15 %;

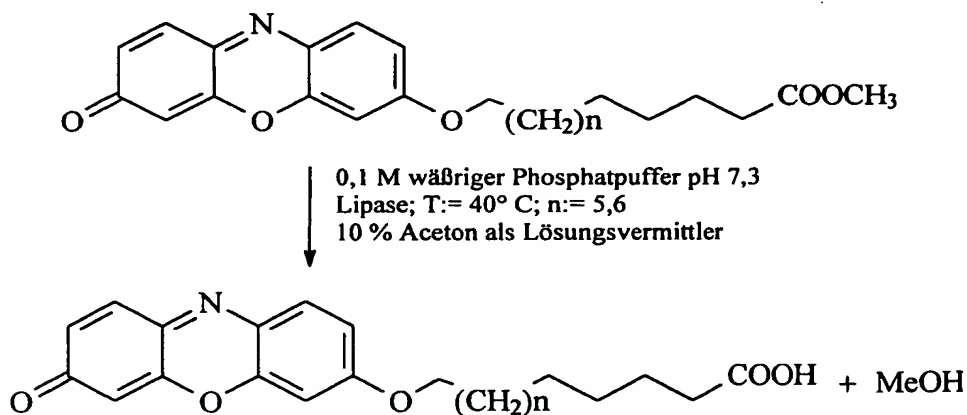
$^1\text{H-NMR}$: δ : = 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,91 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,70 Hz), 6,86 (dd, 1H, -H-8', $J_{8',9'} = 8,90$ Hz, $J_{8',6'} = 2,53$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2',1'} = 9,72$ Hz, $J_{2',4'} = 1,95$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,54 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,94 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,49 Hz), 3,60 (s, 3H, -COO-CH₃), 2,23 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,50 Hz), 1,74-1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,54-1,57 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35-1,42 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18-1,29 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 186,7 (-C-3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 114,5, 107,0, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 51,8 (-COO-CH₃), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

15

b) Darstellung von ω -Resorufinyldodekansäure und ω -Resorufinylundekansäure

20



30 Vorversuche:

Chemische Hydrolyse mittels NaOH führte zur Spaltung des Esters, jedoch konnte das gewünschte gelb-orange Produkt nur in Ausbeuten von 10 % isoliert werden; die Ursache liegt darin, daß der Resorufinyl-Aromat in stark alkalischen

35 Lösungen (pH > 12) unter Farbverlust zerfällt. Auf DC-Plättchen waren fünf Produkte erkennbar. Im alkalischen Medium zeigt der Resorufinylfettsäureester eine grünliche Färbung. Die Spaltung

mittels Lipasen verlief nach Optimierung der Aufarbeitung wesentlich erfolgreicher. Zur Wahl einer geeigneten Lipase wurden folgende Lipasen im Thermomixer bei 40° C über Nacht in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 mit 10% Aceton als Lösungsmitteln getestet: *Candida antarctica* Lipase A und B, *Aspergillus niger* Lipase und *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL). Die *Candida antarctica* Lipase B und die PCL spalten die Resorufinylcarbonsäureester, wobei letztendlich die PCL-Lipase zur präparativen Esterspaltung verwendet wurde.

10

Ansatz für ω -Resorufinyldodekansäure:

40 mg	(94 μ mol)	ω -Resorufinyldodekan-
		säuremethylester
2 ml		Aceton
15 18 ml		Natriumphosphatpuffer, pH 7,3
Spatelspitze		PCL-Lipase

Ansatz für ω -Resorufinylundekansäure:

36 mg	(30 μ mol)	ω -Resorufinylundekan-
		säuremethylester
2 ml		Aceton
18 ml		Natriumphosphatpuffer, pH
7,3		
Spatelspitze		PCL-Lipase

25

Durchführung:

In einem 50 ml Rundkolben werden die Ester in Aceton gelöst, nach Zugabe von 9 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,3 wird eine Spatelspitze PCL zugegeben und bei 40°C über Nacht inkubiert.

30

Der Reaktionsablauf wird mittels DC (Laufmittel Petrolether : Diethylether 1:1) verfolgt. Nach mehrfacher vorsichtiger Extraktion mittels Chloroform wird die Chloroformphase zwei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat vier Stunden getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

35

ω -Resorufinyl Laurinsäure: Ausbeute: 73 %

$^1\text{H-NMR}$: δ := 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,8 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', $J_{8',9'} = 8,87$ Hz, $J_{8',6'} = 2,4$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2',1'} = 9,7$ Hz, $J_{2',4'} = 1,7$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,4 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,7 Hz),
 5 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,34 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,73-1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,55-1,59 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,37-1,41 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,22-1,29 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ := 186,6 (-C-3'), 180,4 (-COO), 163,7, 150,3 146,1,
 10 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 34,2 (-CH₂-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-11).

ω -Resorufinylundekansäure: Ausbeute: 78 %

15 $^1\text{H-NMR}$: δ := 7,63 (d, 1H, -H-9', J = 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,7 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', $J_{8',9'} = 8,9$ Hz, $J_{8',6'} = 2,53$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2',1'} = 9,7$ Hz, $J_{2',4'} = 1,9$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,5 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,9 Hz),
 20 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,74-1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,54-1,59 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35-1,42 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18-1,29 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ := 186,7 (-C-3'), 180,7 (-COO), 163,7, 150,3 146,1,
 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 114,5, 107,0, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 34,1 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

c) Aktivitätstest von P450 BM-3 mit ω -

30 Resorufinyllaurinsäure und ω -Resorufinylundekansäure:

Eine Spatelspitze der 11- oder 12-RCA wurden in 0,5 ml Aceton, Ethanol, THF, Dioxan und 5,5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gelöst. Zu den als Lösungsvermittler fungierenden
 35 organischen Lösungsmitteln wurde 5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gegeben. Nach Zugabe von 5 nmol P450 wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das P450 BM-3 durch

Zugabe von 200 μ l NADPH (50 μ M) reduziert. Nach einer Stunde wurden 200 μ l der jeweiligen Reaktionsansätze in eine Mikrotiterplatte überführt. In der zweiten Reihe sind zusätzlich entsprechende Blindproben ohne NADPH-Zugabe
5 pipettiert.

Referenzbeispiel 6: Analytische Methoden

1. Proteintrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10

Mittels SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Gereinigte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese 1:1 mit SDS-Probenpuffer (Tris/HCl 500 mM, pH 6,8, Glycerin 10 % (v/v), SDS 20 % (w/v), Mercaptoethanol 2 % (w/v), Bromphenolblau 0,05 %) vermischt und 5 min zur Proteindenaturierung auf 95°C erhitzt. Zur Analyse der Proteinexpression in *E. coli*-Zellen wurden nach fünfstündiger Induktionsphase ($OD_{578} = 1,5-2,0$) 1 ml der Kultur abpipettiert
15 und bei 12000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 100 μ l des Probenpuffers aufgeschlossen und 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Nach Abkühlen der Proteinproben auf Eis erfolgte die Proteinauftrennung im Elektrophoresepuffer (9,0 g Tris, 43,2 g Glycerin, 3,0 g SDS, ddH₂O ad 600 ml) bei 25 mA
20 pro Gel.

Als Proteinstandards dienten ein Niedermolekulargewichts-Marker (Phosphorylase B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45,0 kDa, Carboanhydrase 31,0 kDa, Trypsininhibitor 21,5 kDa,
30 Lysozym 14,4 kDa) und ein Hochmolekulargewichts-Kit (Myosin 200 kDa, β -Galaktosidase 116,25 kDa, Phosphorylase-B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45 kDa) von Bio-Rad (Richmond, USA). Zur Proteintrennung wurde ein 7,5 prozentiges Trenngel (2,5 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8), 100 μ l SDS (10% (m/v), 2,5 ml
35 Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid 30 : 1 (Roth), 50 μ l APS, 5 μ l TEMED) und 4 prozentiges Sammelgel (1 ml Sammelgelpuffer (12,11 g Tris, 0,8 g SDS, ad H₂O 200 ml, pH 6,8 mit HCl eingestellt), 0,52 μ l Acrylamid : N,N'-Methylen-

bisacrylamid 30:1 (Roth), 40 μ l APS 10 % (w/v), 4 μ l TEMED verwendet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine drei Stunden lang unter langsamem Schütteln mit Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % Methanol) blau gefärbt. Die Inkubation in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % Methanol) erfolgte bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurde das Gel luftblasenfrei zwischen ein Cellulose-Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und zwei Stunden im Gelrockner (Bio-Rad, Model 583) bei 80°C unter Hausvakuum getrocknet.

Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Nachweis

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchoninsäure- (BCA) Protein-Nachweissystems von Pierce (St. Augustin, Deutschland) spektrometrisch bei 562 nm nach Herstellerangaben entsprechend dem Standardprotokoll bestimmt. Kalibriergeraden wurden mit BSA-Verdünnungen aufgenommen.

3. Spektroskopische Nachweismethoden

Alle spektroskopischen UV-Vis Nachweise wurden unter aeroben Bedingungen in einem Pharmacia Spectrophotometer, Modell BioChrom4060 (APB, Uppsala, Schweden), mit BioChrom4060 Windows 3.11 Software v2.0 durchgeführt.

a) Bestimmung der P450 Konzentration

P450 BM-3 Konzentrationen wurden mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode (Omura et al. 1964) und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 125 nm/min in 0,1 nm Intervallen bestimmt. Dazu wurde zu 5 ml phosphatgepuffertem (20 mM, pH 7,3 bis 7,5) P450 BM-3 Rohextrakt eine Spatelspitze Natriumdithionit und 10 μ l einer 0,1 prozentigen (w/v) wäßrigen Methylviologen-Lösung gegeben. Die abhängig von der

P450 BM-3 Konzentration tiefblaue bis blaugrüne Probe wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine der beiden Fraktionen wurde eine Minute lang mit CO begast, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist, die andere dient als Referenz für die
5 differenzspektroskopische Messung.

b) ~~Messung der Reduktase-Aktivität~~

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in 0,1 M
10 Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt, wobei die Absorptionszunahme bei 550 nm mit $\epsilon = 8,9 \text{ mM}^{-1}$ (Fulco et al. 1992) gemessen wurde. 1 ml Probe enthielten 50 nmol Cytochrom c (aus Pferdeherz), 100 nmol NADPH und eine aus Tabelle 6 ersichtlichen Menge P450 BM-3. Als Referenz diente dieselbe
15 Probe vor NADPH-Zugabe. Die Lösungen wurden frisch bereitet und bis zur Benutzung am selben Tag auf Eis gelagert. Zur Messung der ~~Reduktaseaktivität von P450 BM-3~~ wurde zur Cytochrome c-Lösung nach fünfminütiger Inkubation die NADPH-Lösung gegeben.

20

4. ~~Protokolle zur Charakterisierung von P450 BM-3 und/oder P450 BM-3 F87A~~

Zur Messung der kinetischen Konstanten sowie der pH- und
25 Temperaturstabilität wurde gereinigtes P450 BM-3 F87A verwendet. Für alle anderen Bestimmungen wurde zentrifugierter und filtrierter klarer Rohextrakt verwendet. Für alle Experimente wurden pro Ansatz 0,05-0,2 nmol P450 BM-3 oder P450 BM-3 F87A in einem Gesamtvolumen von 1 ml und 8 μl 5-15
30 mM pNCA-Lösung verwendet. Mit Ausnahme der

~~Lösungsmitteleversuche~~ wurden Charakterisierungsexperimente in 1 ml Einweg-Plastikküvetten durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

35

a) Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen Konstanten wurden nach Zugabe von 792 μl

Tris/HCl (pH 8,2, 0,2 M) und 100 μ l P450 BM-3 zu 8 μ l DMSO-Substratlösung unterschiedlicher Substratkonzentration ermittelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l 1 mM NADPH-Lösung 5 gestartet.

b) Lösungsmittelstabilität von P450 BM-3 F87A

Die Messung der Lösungsmittelstabilitäten erfolgte in 10 Glasküvetten (Hellma, Modell 6040) bestimmt, wobei die Substratlösung statt in DMSO in Aceton, Dioxan, THF und Ethanol gelöst wurde. Die Bestimmungen wurden entsprechend der bei den kinetischen Messungen beschriebenen Vorschrift durchgeföhrt; jedoch wurde in Unterschied dazu der Anteil des 15 Puffers entsprechend der verwendeten Lösungsmittelmenge variiert.

c) pH-Stabilität und Temperaturstabilität von P450 BM-3 F87A

20 Die Messung der pH-Stabilität wurden bei 30°C im Stratagene Robocycler (Modell gradient40) in dünnwandigen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Stratagene) durchgeföhrt. Zu 0,1-0,2 nmol P450 BM-3 wurden 392 μ l phosphatgepufferter Lösung (50 mM, pH 4-10) gegeben. Nach dem Inkubationszeitraum wurde die P450 BM- 25 3 Lösung in eine Küvette überföhrt und 500 μ l Tris/HCl (0,3 M, pH 8,2) und 8 μ l 12-pNCA (6 mM) hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Reaktion mittels 100 μ l NADPH-Lösung (1 mM) gestartet. Die Temperaturstabilität wurde bei einem pH-Wert von 7,5 unter den gleichen Bedingungen wie 30 die pH-Stabilität untersucht.

d) Einfluß von Puffersalzkonzentrationen, Detergenzien, Proteaseinhibitoren, Thio-Verbindungen, Co(III)sepulchrat auf die P450 BM-3 F87 Aktivität

35

Die Auswirkungen dieser Verbindungen auf die P450 BM-3 F87A Aktivität sind in Analogie zu den kinetischen Untersuchungen durchgeföhrt worden, wobei ein variiertes Teil des Puffers

durch die im selben Puffersystem gelöste Untersuchungssubstanz ersetzt wurde.

e) Automatisierter Aktivitätsnachweis

5

Für den automatisierten Aktivitätsnachweis von P450 BM-3 F87A wurden Mikrotiterplatten mit 96 Reaktionskammern (Greiner Frickenhausen, Deutschland) gewählt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 250 μ l in einer Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) mit 18 nmol 10- und 11-pNCA, 12 nmol 12-pNCA oder 10 nmol 15-pNCA, die in 2,2 μ l DMSO gelöst waren. Für die Pipettierarbeiten wurde eine Biomek2000 Pipettierroboter (Beckman Instruments, Fullerton, USA) verwendet. Nach fünfminütiger Inkubationszeit mit 0,02 nmol P450 BM-3 F87A wurde die Reaktion gestartet durch Einspritzen von 25 μ l einer wäßrigen NADPH Lösung (1 mM) in jede Reaktionskammer. In einem FluoStar-Mikrotiterplattenleser (BMG LabTechnology, Offenburg, Deutschland) wurde der Reaktionsablauf bei 405 nm absortiv verfolgt.

20

f) Wasserstoffperoxid-Untersuchungen

Für Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur daß statt NADPH variierte wäßrige Wasserstoffperoxidmengen zugegeben wurden. Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden 0,05-0,1 nmol P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von pNCA-Substrat mit variierten Wasserstoffperoxidmengen fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und einer weiteren fünfminütigen Inkubationszeit wurden zur Reaktionslösung 60 nmol 12-pNCA-Substrat pipettiert. Die Reaktion wurde fünf Minuten später durch Zugabe von 100 μ l NADPH (1 mM) gestartet.

30

g) Zn-Mediator-Untersuchungen

35

Die Reaktionen wurden in einer Schüttelapparatur für Eppendorf-Reaktionsgefäß-Schüttler (IKA-Labortechnik Vibrax mit Janke und Kunkel Aufsatz Typ VX2E) durchgeführt. Für

Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur wurden anstelle von NADPH variierte Mengen an Zink/Cobalt(III)sephulchrat benutzt. Nach variierten Zeitintervallen wurden 100 µl Probe der
 5 Reaktionssuspension entnommen und in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, in dem zum Reaktionsstop 10 µl KOH (6 M) vorgelegt waren. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm gemessen.

10 Beispiel 1: Klonierung, Expression und Reinigung von P450 BM-3 und Mutanten im Gramm-Maßstab

15 1. Klonierung des P450 BM-3 Gens und der Mutante P450 BM-3 F87A und deren Expression in 30-l-Fermentationen

Das P450 BM-3 Gen wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *Bacillus megaterium* isoliert, mit Tags versehen und wie in Figur 1 für die pT-Plasmide gezeigt, in die

20 Expressionsvektoren pCYTEXP1 und pASK-IBA1CA kloniert. Zur Überprüfung der korrekten Insertion des P450 BM-3 Gens, der mit unterschiedlichen Tags versehen P450 BM-3 Varianten und zur Überprüfung der P450 BM-3 F87A Punktmutante wurden die Sequenzierprimer R0_5 bis L7 verwendet. Für die PCR-Reaktionen

25 nach dem Standard-Protokoll wurden für das Wildtyp-Enzym die Primer B1 und B2, für die P450 BM-3His₆ die Primer H1 und H2, für P450 BM-3Glu₆ die Primer G1 und G2, für P450 BM-3Arg₆ die Primer A1 und A2 und für P450 BM-3Strep die Primer S1 und S2 verwendet. Die Sequenzanalyse ergab keinerlei Mutationen für
 30 ~~einen aus jeweils drei sequenzierten pT-USC0BM3- und pT-~~

USC1BM3-Plasmiden. Für pT-USC2BM3 und pT-USC3BM3 wurde nur mit Primer R7 die korrekte Insertion des Tags überprüft. Der sequenzierte pA-USC4BM3-Klon zeigte zwei Mutationen im Reduktaseanteil des P450 BM-3 Proteins. Die Expressionsrate
 35 des mit einem His₆-Tag versehen P450 BM-3 in DH5α war mit Werten von 300 nmol pro Liter Fermenterbrühe um ca. 20 % höher als beim Wildtyp. Aufgrund dieser höheren Expressionsrate wurde pT-USC1BM3 zur Erhöhung der Sensitivität des pNCA-Tests

an Position 87 durch Austausch eines Phenylalanins gegen Alanin mit den Stratagene QuikChange-Kit punktmutiert. Durch die PCR-Reaktion mit den Primern F87A1 und F87A2 enthält pT-USC1BM3F87A an der Mutationsposition ohne weitere Veränderung der Proteinsequenz eine zusätzliche EaeI-Restriktionsschnittstelle, die zur Selektion des zur Sequenzierung ausgewählten Klon verwendet wurde. Diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle führt nach Restriktionsspaltung mit EaeI zum Auftreten einer neuen Bande bei ca. 800 bp in Spur 2 und einer gegenüber dem Wildtyp-Verdau in Spur 1 deutlich kleineren Bande bei 1,7 kbp. Nach Plasmidisolation wurden acht Klone mit EaeI verdaut (2 μ l EaeI-Puffer (10x), 1 μ l EaeI 3,2 μ l pT-USC1BM3, ad 20 μ l ddH₂O, 1 h bei 37°C). Ein Klon wurde sequenziert. Das pT-USC1BM3F87A Plasmid besitzt in der Linker-Region an Position 470 eine zusätzliche Mutation R470C. Auf eine Rückmutation wurde verzichtet aufgrund der Lokalisation der Mutation R470C am Ende der Linker-Region, die den P450-Anteil des P450 BM-3 mit dem Reduktaseanteil verbindet und keinerlei Einfluß auf die P450 BM-3 Aktivität zeigt.

2. Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ziel war es, eine kostengünstige, rasche und im präparativen Maßstab durchführbare Methode zur Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A zu entwickeln. Dazu wurde ein Arg₆-, His₆-, Glu₆- und Strep-Tag an das C-terminale Ende von P450 BM-3 angefügt. Auf der Basis des His₆- und Strep-Tag sollten Affinitätsreinigungen und auf Basis des Arg₆- und Glu₆-Tags chromatographische Reinigungen mit Ionenaustauschern entwickelt werden. Ein Einfügen eines Tags an das N-terminale Ende des P450 BM-3 Gens wurde wegen der Lokalisation des N-Terminus im Bereich des flexiblen Substrateingangskanals nicht in Betracht gezogen. Eine Modifikation in diesem Bereich würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung der P450 BM-3 Aktivität und Selektivität führen.

2.1 Proteinreinigungen mit Affinitätschromatographie

a) P450 BM-3 mit His₆-Tag

Bei der P450 BM-3His₆-Reinigung über Metallchelatchromatographie binden mehr als 95 % der aufgetragenen 4 mg P450 BM-3 nicht an die 20 ml XK16/20-Affinitätssäule bei einem linearen 0-0,5 molaren Imidazolgradienten (10CV). Die chromatographische Reinigung mit Zn²⁺-Ionen wurde nach dem Pharmacia-Standardprotokoll durchgeführt. Das wenige aufgereinigte P450 BM-3 zeigte im NADPH-Assay keine Aktivität mehr. Die Ursache dieser Inhibierung konnte auf den Einfluß von Imidazol zurückgeführt werden. Imidazol bewirkt ein Ablösen des fünften Cysteinat-Liganden am katalytischen Häm-Zentrum. Diese Abdissoziation des fünften Liganden vom Häm-System führt zur sofortigen P450-Inaktivierung und zeigt sich im CO-Differenzspektrum durch eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums von 448 nm nach 420 nm.

b) P450 BM-3 mit Strep-Tag

20

Zur Aufreinigung wurden 8,2 mg P450 BM-3Strep verwendet. Vergleichbar den Ergebnissen der His₆-Tag Reinigungen zeigte P450 BM-3Strep keine Bindung an die Strepavidin-Affinitätsmatrix bei der Reinigung entsprechend dem READY TO JSE KIT (IBA, Göttingen).

c) P450 BM-3 mit Glu₆-Tag

Ein Vergleich der linearen 0-1 M NaCl-Gradienten (12 CV, ~~30 Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,0)) zeigte für P450 BM-3Glu₆ bei~~ Verwendung von Super 650M- und DEAE 650M-Anionenaustauschern keine Unterschiede im Elutionsverhalten zum Wildtyp-Enzym.

d) Schlußfolgerungen

35 Die Ergebnisse der Reinigung von P450 BM-3 mit His₆-, Glu₆- und Strep-Tag lassen darauf schließen, daß das C-terminale Ende von P450 BM-3 nicht frei zugänglich an der Proteinoberfläche liegt und somit nicht für Reinigungszwecke verwendbar ist.

Ferner verursachte im Falle des His₆-Tags die Elution mittels Imidazol eine rasche Proteininaktivierung durch Verdrängung des fünften Liganden am Porphyrin-System.

5 2.2 Anionenaustauschchromatographie

Um die Kosten zu minimieren, sollte eine effektive, kostengünstige und zeitsparende Reinigungsmethode für P450 BM-3 entwickelt werden, die eine einfache Maßstabsvergrößerung erlaubt. Als Methoden zur P450 BM-3 Reinigung standen nach den Ergebnissen der Reinigung von P450 BM-3 mit Tags somit noch nur HIC-Materialien und Ionenaustauscher zur Verfügung. Die Entscheidung fiel zugunsten der Anionenaustauscher, die in der Regel billiger sind und ein einfacheres Handling bieten.

15

a) Linearer und Stufengradient

Um eine Anionenaustauschchromatographiemethode zu entwickeln wurden vier unterschiedlich starke Anionenaustauschermaterialien DEAE 650S (35 μ m), DEAE 650M (65 μ m), SuperQ 650M (65 μ m) und QAE 550M (65 μ m) auf ihre Eignung hin untersucht. In ersten Experimenten wurde mit jedem Säulenmaterial ein 10-Säulen-Volumen (CV) langer linearer 0-1 M NaCl-Gradient zur Reinigung von 6-10 mg P450 BM-3 Rohextrakt in einem Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8) aufgenommen. In allen Fällen betrug die Ausbeute 80-84 %. Die höchsten Proteinanteile im P450 BM-3 Elutionspeak zeigte das DEAE-Material, dicht gefolgt vom SuperQ- und QAE-Material.

30

Für die weitere Verbesserung der Auflösung mittels gestufter Salzgradienten war die Fähigkeit des ÄKTAexplorer-Systems hilfreich, gleichzeitig Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm und 417 nm aufzuzeichnen. Ein optimierter Zwei-Stufen-Salzgradient für die DEAE 650M Chromatographiesäule besitzt eine erste Stufe von 150 mM NaCl und eine zweite mit 250 mM NaCl. Die P450 BM-3 Elution beginnt, wie aus den Leitfähigkeitswerten des linearen NaCl-Salzgradienten ablesbar, bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration von 150 mM

35

auf 170 mM. Die minimale obere Salzstufe wurde zu 250 mM NaCl ermittelt; NaCl-Konzentrationen < 230 mM verursachen eine Verbreiterung des P450 BM-3 Elutionspeaks, und NaCl-Konzentrationen > 300 mM führen zu einem deutlich schlechteren
5 Reinigungseffekt. Die Salzstufen wurden für die Chromatographiematerialien SuperQ 650M und QAE 550M in vergleichbarer Weise optimiert.

Ein Vergleich des linearen DEAE 650M mit dem gestuften NaCl-
10 Gradienten führt zu einer Erhöhung des P450 BM-3 Proteinanteils im Elutionspeak von 39 % beim linearen, auf 84 % beim gestuften Gradienten. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem SuperQ 650M Chromatographiematerial erreicht; das QAE
15 550M Chromatographiematerial zeigte deutlich schlechtere Reinigungsergebnisse. Bei den gestuften Reinigungsmethoden lagen die Ausbeuten in allen Fällen bei > 78 %; die höchsten Ausbeuten von 93 % an P450 BM-3 im Elutionspeak wurden mit DEAE 650S erzielt.

Beispiel 2: Entwicklung eines spektroskopischen
Aktivitätsnachweises für P450 BM-3 und P450 BM-3
F87A

Ziel war es einen spektrometrischen oder fluorimetrischen
 Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln. Ein solcher
 Aktivitätsnachweis kann im Gegensatz zu Standardmethoden wie
 10 HPLC oder GC einfach automatisiert und somit zum Auffinden von
 weiteren P450 BM-3 Enzymvarianten verwendet werden.

Um einen neuen Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln,
 wurden verschiedene Verbindungen, die am terminalen C-Atom der
 15 Carbonsäuren das Chromophor tragen, synthetisiert und auf ihre
 Eignung untersucht.

Arbeiten von Oliver et al. ~~in~~ Biochemistry (1997), 36(7):1567
 zeigten für Laurinsäure und Myristinsäure als Substrat eine
 20 Verschiebung des Hydroxylierungsprofils von P450 BM-3 von
 subterminalen Positionen zur terminalen Position, falls
 Phenylalanin an Position 87 durch Alanin ersetzt wurde. Zur
 Erhöhung der Sensitivität der pNCA-Nachweismethode wurde diese
 Punktmutation, wie in Material und Methoden beschrieben,
 25 eingefügt und mittels Sequenzanalyse bestätigt.

1. Nachweisprinzip

Figur 2 zeigt das Prinzip zu einem spektrometrischen
 30 Aktivitätsnachweis für terminal hydroxylierende

Fettsäurehydroxylasen. Nach terminaler Hydroxylierung entsteht
 ein instabiles Halbacetal, das in die ω -Oxycarbonsäure und das
 spektrometrisch detektierbare Chromophor dissoziiert.

35 2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit PCA

a) Synthese der Phenoxycarbonsäuren (PCA)

Die PCA-Verbindungen wurden in einer einstufigen Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von ω -Bromcarbonsäuren synthetisiert. Die Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten zwischen 76 und 78 %. Charakterisiert wurden
 5 die PCAs mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR und Schmelzpunktbestimmung.

b) Wahl der Reaktionsbedingungen

10 1. Um die Phenolbildung spektroskopisch nachweisen zu können, bietet es sich an, die Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 280 nm zu messen (Luchter-Wasylewska 1996).
 Der geringe Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum bei 274 nm von $\epsilon = 1090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, das unterschiedliche Absorptionsverhalten
 15 von NADPH und NADP^+ in diesem Wellenbereich und die Bildung von Wasserstoffperoxid in ungekoppelten Reaktionen verhinderten jedoch eine kontinuierliche spektroskopische Messung der Phenolbildung. Aus diesen Gründen wurde der Merck-Phenol-Nachweis Kit, zur Quantifizierung der Produktbildung verwendet.
 20 Mit NADPH als Cofaktor ergaben sich bei Verwendung der P450 BM-3 Mutante F87A für 12-PCA Umsatzgeschwindigkeiten von 640 eq/min und für 11-PCA von 410 eq/min.

3. Nachweis der P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A Aktivität mit pNCA-Substraten

a) Synthese der p-Nitrophenoxycarbonsäuren (pNCA)

Die pNCA-Verbindungen wurden in einer neuen, dreistufigen
 30 Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von
 ω -Bromcarbonsäuren durch Veresterung, sich anschließender $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit dem Natrium-p-Nitrophenolat und lipasekatalysierter Hydrolyse der Ester, synthetisiert. Die dreistufigen pNCA-Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten
 35 zwischen 61 und 69 %. Charakterisiert wurden die pNCAs mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR und Schmelzpunktbestimmung.

b) Wahl der Reaktionsbedingungen

In Figur 2 ist das Reaktionsprinzip der Umsetzung von pNCA-Substraten durch P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A beschrieben. Für die Aktivitätsmessungen mußten pH-Wert und Wellenlänge des spektroskopischen Nachweissystems optimiert werden. Nur

deprotoniertes p-Nitrophenolat (pKs-Wert 7,1) trägt zur gelben Farbe bei; für die Nachweisempfindlichkeit wäre somit ein pH-Wert $>9,1$ ($>99\%$ deprotoniert) empfehlenswert. Die pNCA-

Verbindungen sind in stark alkalischen Lösungen stabil, im Gegensatz zum P450 BM-3 Protein, das bei pH 10 und 30°C

innerhalb von 5 min 80 % seiner Aktivität verliert. Als Kompromiß zwischen Proteinstabilität und Sensitivität der Nachweismethode wurde ein pH-Wert von 8,1 bis 8,2 gewählt. Berechnungen auf der Basis der Henderson-Hasselbach-Gleichung

zeigen, daß in diesem pH-Bereich 90-92 % des umgesetzten p-Nitrophenols deprotoniert sind und zur gelben Farbe beitragen.

Das Absorptionsmaximum von p-Nitrophenolat liegt bei 400 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren jedoch auch das Häm-Zentrum und der Cofaktor NADPH. P450 BM-3 besitzt ein starkes

Absorptionsverhalten zwischen 350 und 450 nm, das in Abhängigkeit von Substratbindung und Oxidationsstufe des Eisens im katalytischen Zentrum stark schwankt. und. Das

Absorptionsspektrum von NADPH begrenzt den Wellenlängenbereich auf $>390\text{ nm}$. Die Wellenlänge 410 nm wurde aufgrund der Reproduzierbarkeit letztendlich zur Aktivitätsmessung

ausgewählt. Falls die Sensitivität des Nachweissystems nicht ausreichend ist, sollte bei Wellenlängen im Bereich von 400 nm gearbeitet werden. Unter den gewählten Nachweisbedingungen (pH 8,2, 410 nm) wurde der Extinktionskoeffizient bestimmt zu

$\epsilon = 13200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

pNCAs besitzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit, so daß ein Lösungsvermittler benötigt wird. Dazu kann DMSO ohne

Beeinflussung der P450 BM-3 F87A Aktivität bis zu Konzentrationen von 1 % (v/v) zugegeben werden. 0,8 % (v/v)

DMSO wurden deshalb als Lösungsvermittler im Aktivitätsnachweissystem verwendet.

Der Zeitbedarf des pNCA-Nachweissystems hängt stark von der verwendeten Enzymmenge ab. Falls nmol-Mengen an P450 BM-3 F87A

im pNCA-Aktivitätsnachweis eingesetzt wurde, war 1 min zum

Aktivitätsnachweis ausreichend.

c) Automatisierung des pNCA-Nachweises

5 Für den Einsatz in einer HTS-Umgebung wurde der pNCA-Aktivitätsnachweis unter Benutzung einer Biomek2000 Arbeitsstation und eines BMG FluoStar Mikrotiterplattenleser automatisiert. Unter Verwendung von P450 BM-3 und der Mutante F87A wurde in jeweils 16 Messungen mit den pNCA-Substraten 10-,
10 11-, 12- und 15-pNCA die Reproduzierbarkeit des Assaysystems untersucht. Bei den Gesamtaborptionen gab es aufgrund von Pipettierungenauigkeiten Unterschiede um den Faktor zwei bis vier, die Reaktivitätsunterschiede schwankten jedoch nur zwischen 2 und 6 %. Die beste Reproduzierbarkeit wurde für die
15 P450 BM-3 F87A Mutante erzielt mit Abweichungen ~ 2 % und die schlechteste für den Wildtyp und 15-pNCA mit Abweichungen von bis zu 6 % vom Mittelwert aller Messungen. Ursächlich für die Genauigkeitsunterschiede sind die unterschiedliche Löslichkeit der pNCA-Substrate und verschiedene Umsätze in Abhängigkeit von
20 der Kettenlänge.

Die F87A Mutante setzt 12-pNCA vollständig um, während das Wildtyp-Enzym nach 33 % stoppt. Die Ursache liegt vermutlich in subterminal hydroxylierten 12-pNCA-Verbindungen, die nicht mehr
25 oder nur noch langsam weiter umgesetzt werden. Für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A sind das pNCA-Kettenlängenprofil und der Umsatz aus w-Hydroxylierung der pNCAs, berechnet aus dem Quotienten von beobachteten zu gemessener Gelbfärbung der Lösung in den folgenden Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt.
30 Zusätzlich wurden für P450 F87A die kinetischen Daten aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt.

Tabelle 4

Kettenlänge der pNCA-Verbindung	P450 BM-3 F87A k_{cat} [eq ^a /min]	P450 BM-3 F87A w-Hydroxylierungsprodukte [%]	P450 BM-3 Wildtyp k_{cat} [eq ^a /min]	P450 BM-3 Wildtyp w-Hydroxylierungsprodukte [%]
6	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt
8	1	<1	2	<1
10	426	94	322	98
11	204	64	267	63
12	574	100	114	33
15	680	61	246	35

^a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird Equivalente (eq) verwendet

Tabelle 5

Kettenlänge der pNCA-Verbindung	P450 BM-3 F87A k_{cat} [eq ^a /min]	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ *min ⁻¹]
10	426 " 32	42 " 8	$1.0 \cdot 10^7$
11	204 " 18	69 "	$3.4 \cdot 10^5$
12	574 " 47	6,2 "	$1.1 \cdot 10^4$
15	680	-	-

^a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird Equivalente (eq) verwendet

Beispiel 3: Neues Cofaktor-System für P450 BM-3 und P450
BM-3 F87A

Ein Haupthindernis der industriellen Nutzung von P450-Systemen
 5 sind die Kosten, die der Cofaktor NADPH verursacht. Zur Lösung
 des Kostenproblems wurde ein alternatives Cofaktor-Konzept
 entwickelt, bei dem NADPH durch Zink und den Mediator
 Cobalt(III)sepulchrat ersetzt wurde; Zink dient als
 Elektronenquelle und Cobalt(III)sepulchrat als
 10 Elektronentransportsystem vom Zink zum P450 BM-3.

1. Nachweis der Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat durch
) Zink

15 Cobalt(III)sepulchrat besitzt unter Standardbedingungen ein
 Normalpotential von -0,54 V gegen eine Kalomel-Elektrode
 (Creaser et al., J. Am. Chem. Soc. (1977) 99: 3181). Es läßt
 sich, wie in Abbildung 48 gezeigt, mittels Zn-Staub in einem
 Tris/HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,2) innerhalb von Sekunden
 20 reduzieren. In Gegenwart von Luftsauerstoff in wäßrigen
 Lösungen wird es innerhalb weniger Minuten wieder zu
 Cobalt(III)sepulchrat oxidiert.

2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit alternativem
 25 Cofaktor-System

2.1 pNCA-Assay

Figur 4 zeigt die Umsetzung von 12-pNCA mittels des
 30 Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A Systems. Bei einem
 Absorptionsmaximum von 0,8 nach 8 min zeigt das
 Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A System eine gelbe
 Farbe, die einem 70%igen Umsatz entspricht. Innerhalb von 20
 min verschwindet die durch p-Nitrophenolat verursachte gelbe
 35 Farbe völlig; der Restabsorptionswert von 0,15 stammt vom
 Mediator. Kontrollexperimente zeigten, daß Zn-Pulver die
 Nitrogruppe von p-Nitrophenolat im Tris/HCl-Puffer (pH 8,2,
 50 mM, 0,25 M KCl) reduziert. Weitere Kontrollexperimente

zeigten, daß Wasserstoffperoxid keinen oxidativen Einfluß auf *p*-Nitrophenolat und pNCAs hat.

In Figur 5 sind die beschriebenen Elektronentransferwege von Zn über den Mediator zum P450_{BM-3} und der Substratumsetzung unter Berücksichtigung des verkürzten Wasserstoffperoxid-Reaktionswegs ("shunt-pathway") dargestellt.

2.2 PCA-Assay

Aufgrund der Reduktion von *p*-Nitrophenol durch Zink in einem Tris/HCl-Puffer wurde 12-pNCA durch 12-PCA ersetzt. Der Phenolnachweis erfolgte mittels des Merck-Phenolnachweis-Kits bei 495 nm. Ein direkter photometrischer Phenolnachweis bei 274 nm ist aufgrund des Absorptionsverhaltens des oxidierten und reduzierten Cobalt(III)sepulchrat nicht möglich. Figur 6 verdeutlicht für 12-PCA als Substrat eine im Vergleich zu 12-pNCA langsame Entfärbung (Figur 4). Als Ursache für die Absorptionsabnahme konnte Wasserstoffperoxid identifiziert werden, das durch reduziertes Cobalt(II)sepulchrat in Nebenreaktionen durch Reduktion von Luftsauerstoff in wäßrigen Lösungen gebildet wird. Ferner tritt Wasserstoffperoxid-Bildung bei P450-Systemen infolge von ungekoppelten Reaktionen als Nebenreaktionsprodukt immer auf. Aus letzterem Grund wurde eine weitere Optimierung der PCA-Reaktionsbedingungen nicht weiter verfolgt.

In Gegenwart von 600 U Katalase erfolgt, wie in Figur 6 gezeigt, die Absorptionsabnahme bei 495 nm deutlich langsamer.

3.1 Pufferzusammensetzung

Um die Entfärbung der Lösung durch die Reduktion von *p*-Nitrophenolat mittels Zink zu vermeiden, wurde zunächst erfolglos die KCl-Konzentration und der pH-Wert im Rahmen der P450 BM-3 F87A Stabilität variiert (6,5-8,5). Erfolgreich, wie in Figur 7 gezeigt, kann die Reduktion von *p*-Nitrophenol durch

Zink mittels Zusätzen an Kaliumphosphat-Puffer verhindert werden. Ab einem Kaliumphosphatanteil $\geq 10\%$ wird *p*-Nitrophenol nur noch in geringem Ausmaß ($\leq 10\%$) durch Zn reduziert und bei einer 1:1 Mischung ist selbst nach 14 h keine weitere Reduktion mehr feststellbar (nicht abgebildet). Wie in Figur 7 gezeigt, verringert sich der Anteil an reduziertem Co(II)sepulchrat im Mischungsbereich bis zu 20 % Kaliumphosphat zunächst deutlich um ca. $\sim 25\%$, um dann zwischen 20 und 70 % (v/v) Kaliumphosphat-Anteil konstant zwischen 60 bis 70 % zu verharren. Die im Vergleich zum Tris/HCl-Puffersystem geringere Verfügbarkeit an reduziertem Cobalt(II)sepulchrat führt zu einem Aktivitätsverlust von ca. 5 %.

Aus obigen Ergebnissen wurde für die weiteren Optimierungen eine 1:1 Mischung beider Pufferlösungen verwendet.

1.2 Einfluß der Mediatorkonzentration auf den Umsatz und die P450 BM-3 F87A Aktivität

Figur 8A zeigt den Einfluß des Cobalt(III)sepulchrat Mediators auf die P450 BM-3 Aktivität im NADPH-Assay bei variierten Mediatorkonzentrationen. Bei Cobalt(III)sepulchrat-Konzentrationen ≥ 5 mM bildete sich während des Reaktionsablaufs ein kolloidaler Niederschlag, der vor Absorptionsmessung mittels Zentrifugation abgetrennt wurde. Für Umsetzungen mit dem Zink/Cobalt(III)sepulchrat-System ist eine optimale Cobalt(III)-sepulchrat-Konzentration im Bereich von 0,5-0,75 mM pro 0,072 nmol P450 BM-3 F87A vorhanden. Wie in Figur 8B gezeigt, inhibiert Cobalt(III)sepulchrat bis zu Konzentrationen $\leq 0,5$ mM P450 BM-3 F87A selbst in Abwesenheit von Substrat nur geringfügig. Der Inhibierungsgrad bleibt bei variierten Inkubationszeiten konstant und hängt nur vom Konzentrationsverhältnis Cobalt(III)sepulchrat zu P450 BM-3 F87A ab.

3.3 Zn-Konzentration

Die Abhängigkeit des Umsatzes von 0,072 nmol P450 BM-3 F87A von der eingesetzten Zinkpulvermenge ist in Figur 9 gezeigt. Ein optimaler Umsatz wurde im Bereich von 20 bis 40 mg Zink pro Milliliter Reaktionslösung erzielt. Für die

- 5 Umsatzrückgänge bei 50 und 100 mg war vermutlich eine abnehmende Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung durch zunehmende mediator-katalysierte Wasserstoffperoxidbildung verantwortlich.
- 10 Ein Ersatz von Zinkpulver durch Zinkgranalien führte selbst bei Verwendung von 100fach erhöhten Mengen nur zu sehr geringen Umsatzgeschwindigkeiten (Faktor >20 geringer).

15 3.4 Einfluß der H_2O_2 -Konzentration

- Um den Anteil des Wasserstoffperoxid über den shunt A Reaktionsweg zur 12-pNCA-Umsetzung durch P450 BM-3 F87A beiträgt, zu bestimmen, wurden 12-pNCA und P450 BM-3 F87A mit
- 20 variierten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen inkubiert. Im Bereich von 8-20 μM Wasserstoffperoxid wird bei vergleichbaren P450 BM-3 F87A Aktivitäten nach einer Minute bei einem 20-25%igen Umsatz eine Plateau erreicht, unabhängig von der Wasserperoxid-konzentration. Die weitere Zugabe von NADPH im
- 25 Überschuß (100 μM) zeigt, daß P450 BM-3 F87A durch Wasserstoffperoxid nicht vollständig inaktiviert wird. Die Restaktivitäten sind bei geringen Wasserstoffperoxid-Konzentration hoch und sinken mit zunehmender Wasserstoffperoxid-Konzentration (nicht gezeigt).

30

- Um die Stabilität von P450 BM-3 gegenüber Wasserstoffperoxid zu bestimmen, wurde P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von Substrat (12-pNCA) 5 min mit variierten Wasserstoffperoxid-mengen inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und 60 nmol
- 35 Substrat wurden die Umsatzgeschwindigkeiten unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator bestimmt.

Wie in Figur 10 gezeigt, inhibieren in Abwesenheit von

Substrat bereits Wasserstoffperoxid-Konzentrationen im 5 μM -Bereich die P450 BM-3 F87A Aktivität deutlich. Als Konsequenz ergibt sich hieraus für einen P450 BM-3 F87A Enzym-Membran-Reaktor, bei möglichst hohen Substratkonzentrationen zu
5 arbeiten und die Wasserstoffperoxidbildung durch Katalase-oder Anti-Oxidant-Zugabe zu minimieren.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neuartiges Elektronendonorsystem
5 für Enzyme mit Redoxeigenschaften, und dessen Verwendung in
enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der
Herstellung von hydroxylierter Fettsäuren. Die Erfindung
betrifft außerdem ein verbessertes Nachweisverfahren für
Fettsäuremonooxygenasen, Bioreaktoren sowie Testkits, worin das
10 Elektronendonorsystem vorteilhaft einsetzbar ist.

Patentansprüche

1. Elektronendonorsystem für die Übertragung von Elektronen
5 auf Enzyme mit Redox-Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt, der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist.
- 10 2. Elektronendonorsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ein Cytochrom P450-haltiges Enzym ist.
- 15 3. Elektronendonorsystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Monooxygenase (E.C. 1.14.--) ist.
4. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden
20 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ein Standard-Normalpotential im Bereich von weniger als etwa - 0,4 V besitzt.
5. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden
b Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ausgewählt ist unter Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen, Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN und FAD.

- 30 6. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator ist.
- 35 7. Elektronendonorsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle metallisches Zink ist.

8. Elektronendonorsystem, nach einem der vorhergehenden Ansprüche, ausgewählt unter den Systemen:

- ~~Zn/Kobalt(III)sepulchrat~~ und
- ~~Zn/Neutralrot~~.

5

9. ~~Verfahren zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man das Wasserstoff-~~
~~Donormolekül in einem Reaktionsmedium, umfassend das~~
~~Sauerstoff-übertragenden Enzym und ein~~
~~Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in~~
~~Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen~~
~~inkubiert.~~

- 15 10. ~~Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Wasserstoff-Donormolekül ausgewählt ist, unter Verbindungen der Formel~~



worin

- 20 R ~~für einen Alkylrest mit 10 oder mehr Kohlenstoffatomen steht, und~~
 X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril-, Sulfat-, Sulfon- Amin- oder Hydroxygruppe, steht.

11. Verfahren zur enzymatischen Herstellung terminal oder subterminal (Position ω -1 bis -4) hydroxylierter Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man

- 30 a) ~~eine hydroxylierbare Fettsäure oder Fettsäurederivat in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase und Sauerstoff umsetzt; und~~
 b) das (die) hydroxylierte(n) Produkt(e) isoliert.

35

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das ω -hydroxylierbare Fettsäurederivat ausgewählt ist

unter terminal gesättigten, verzweigten oder unverzweigten Fettsäuren mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen, insbesondere C₁₂ - C₃₀-Fettsäuren.

- 5 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Cytochrom P-450 Monooxygenase ist, ausgewählt unter:
- a) dem aus *Bacillus megaterium* (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder
 - 10 b) einer durch Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Position 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 erhältlichen Mutanten des Wildtypenzym.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß
15 die Mutante in Position 87 die Mutation F87A oder F87V und gegebenenfalls wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen aufweist: L188K, A74G, R47F und V26T.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch
20 gekennzeichnet, daß das Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sephalochelat ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart
b von Chloridionen durchführt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms durchführt.

30

18. Bioreaktor zur Verwendung bei der Herstellung ω -hydroxylierter Fettsäuren, gekennzeichnet durch immobilisierte Monooxygenase und ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8 im flüssigen
35 Reaktionsmedium.

19. Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, dadurch

gekennzeichnet, daß man

- a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer ω -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, abspaltbaren Chromophor oder Fluorophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 inkubiert; und
- b) die Abspaltung des Chromophors oder Fluorophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

10

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms und gegebenenfalls in Gegenwart von Chloridionen durchführt.

15

21. Testkit, umfassend ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
-

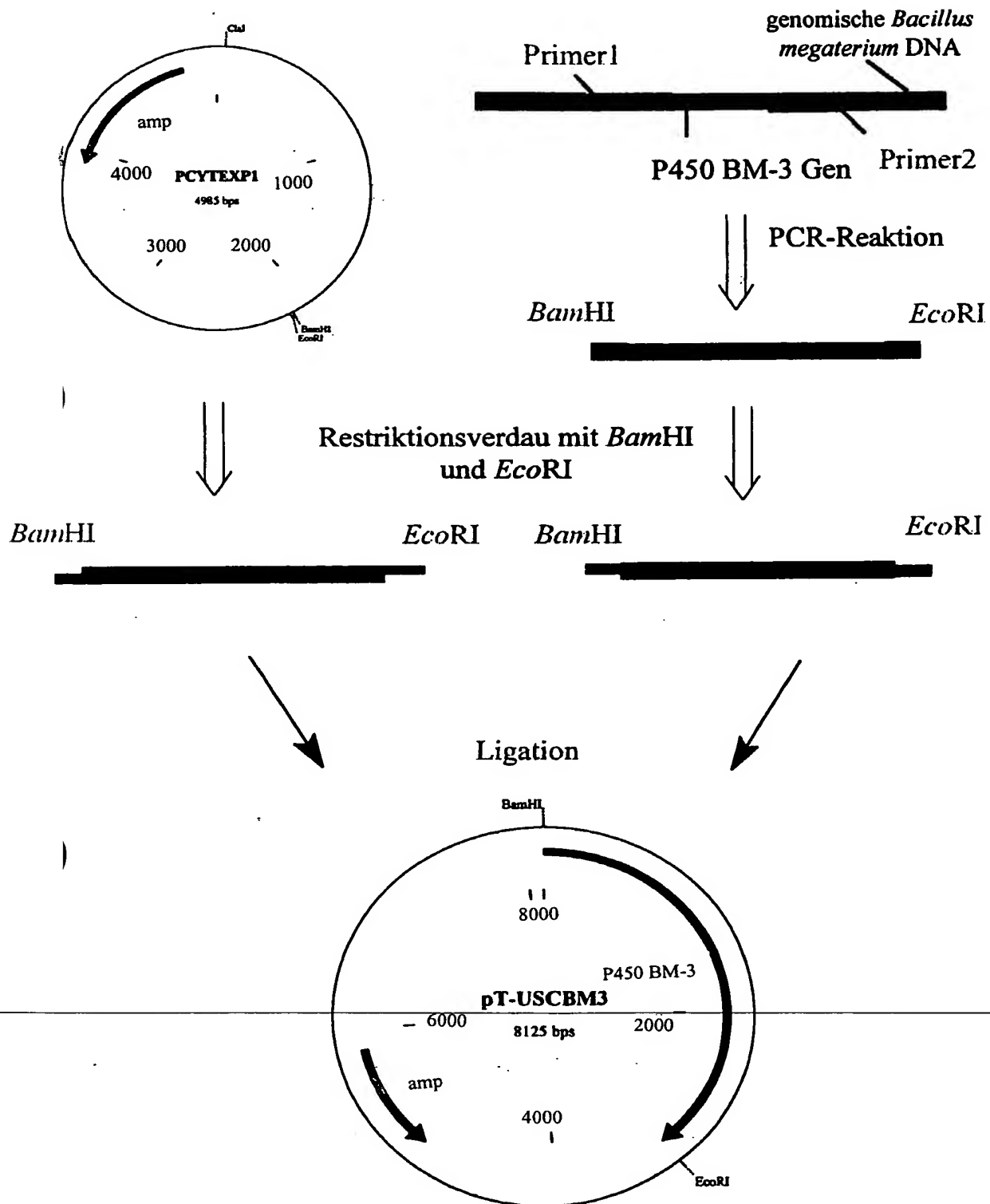


Fig.1

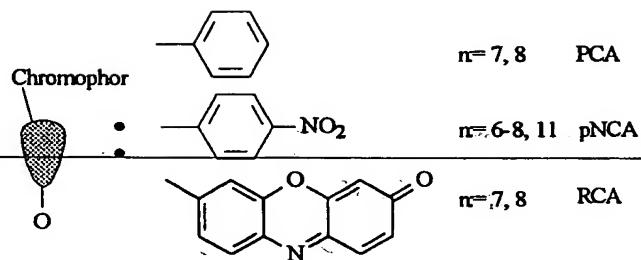
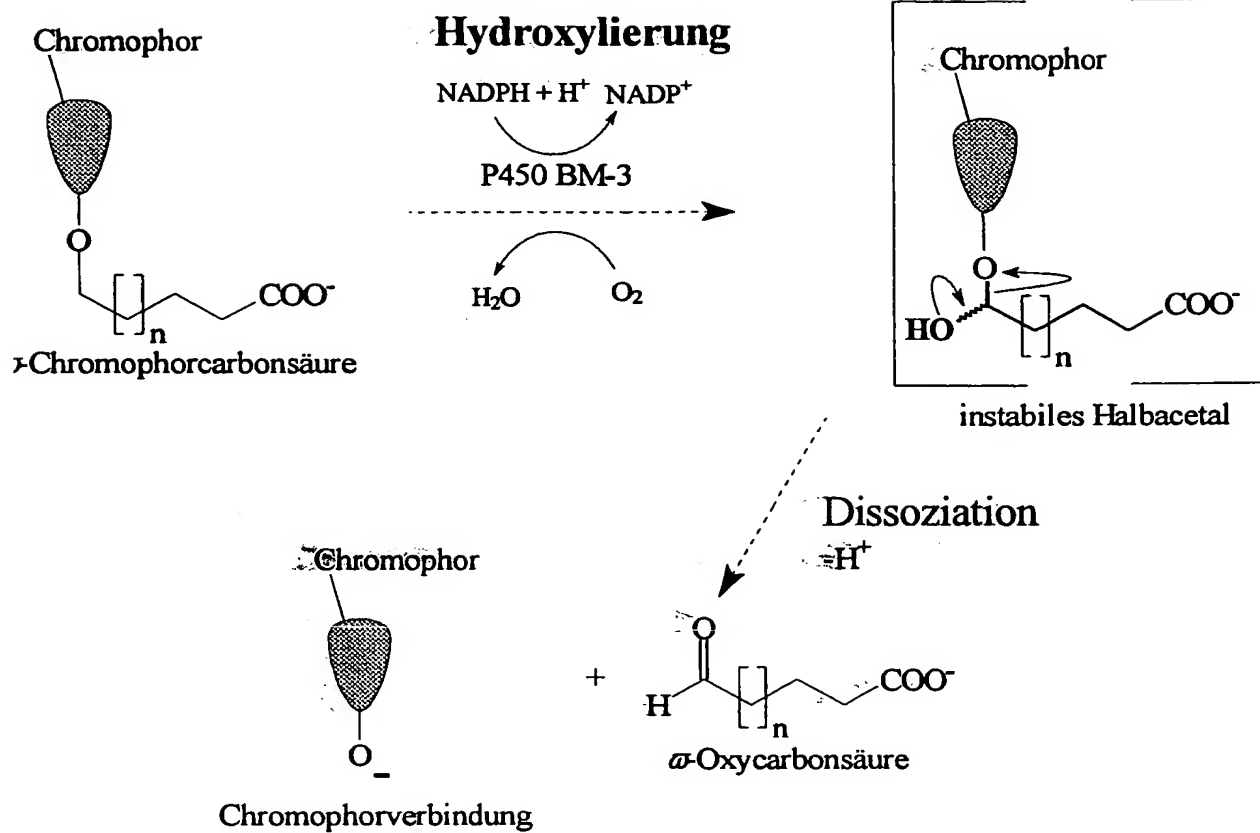


FIG.2

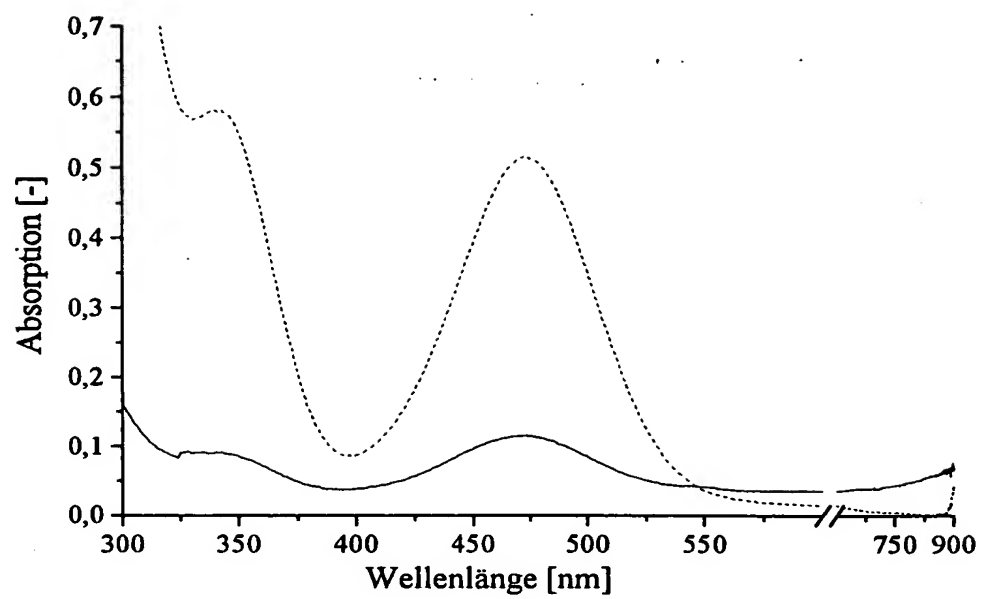


Fig.3

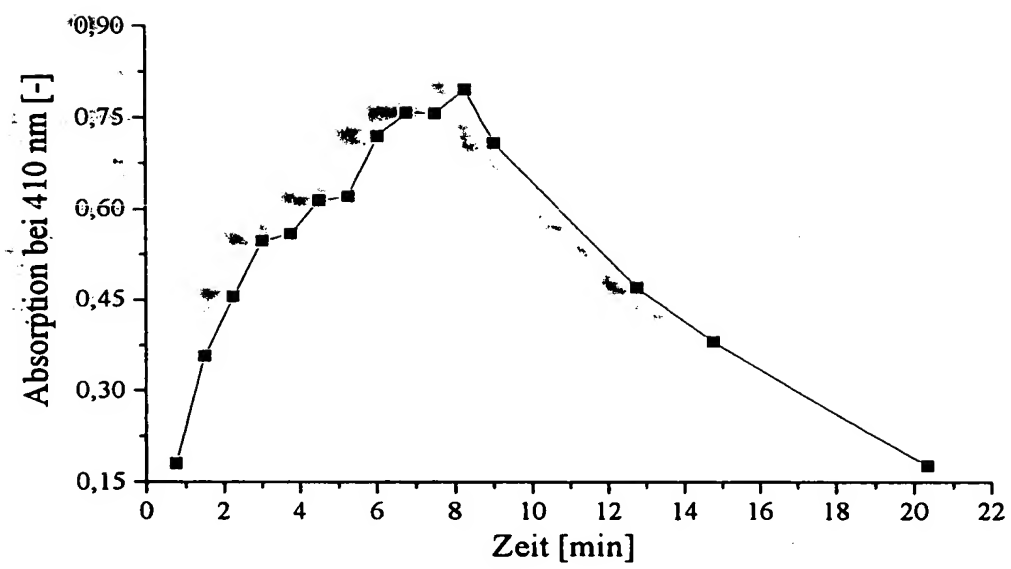


Fig.4

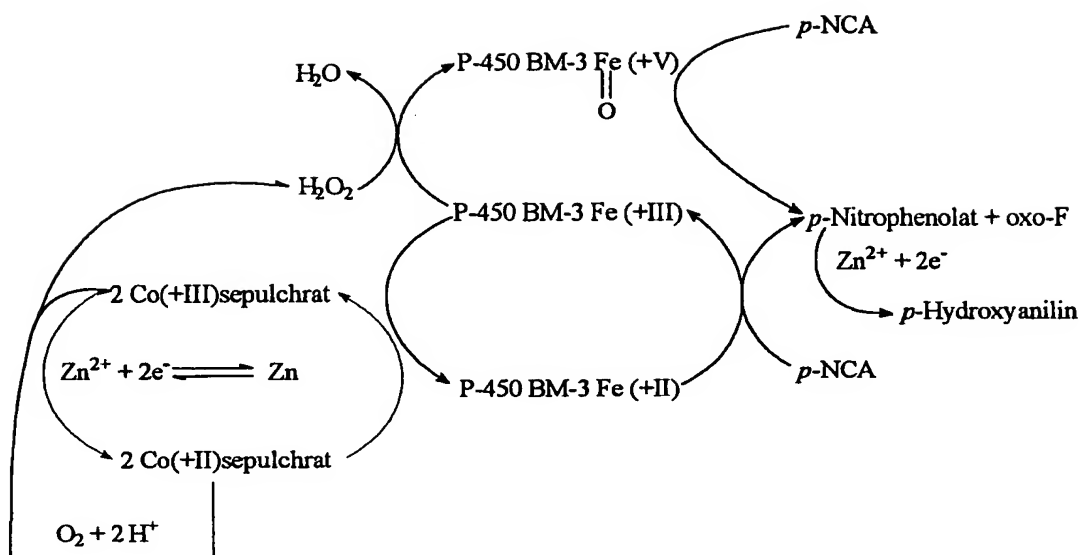


Fig.5

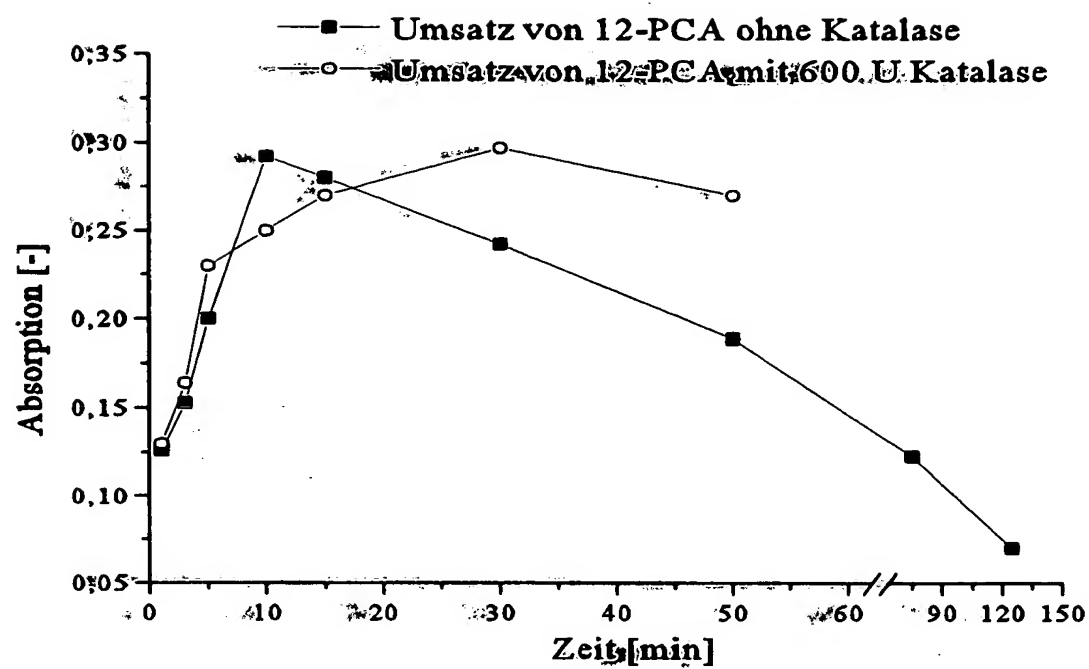


Fig.6

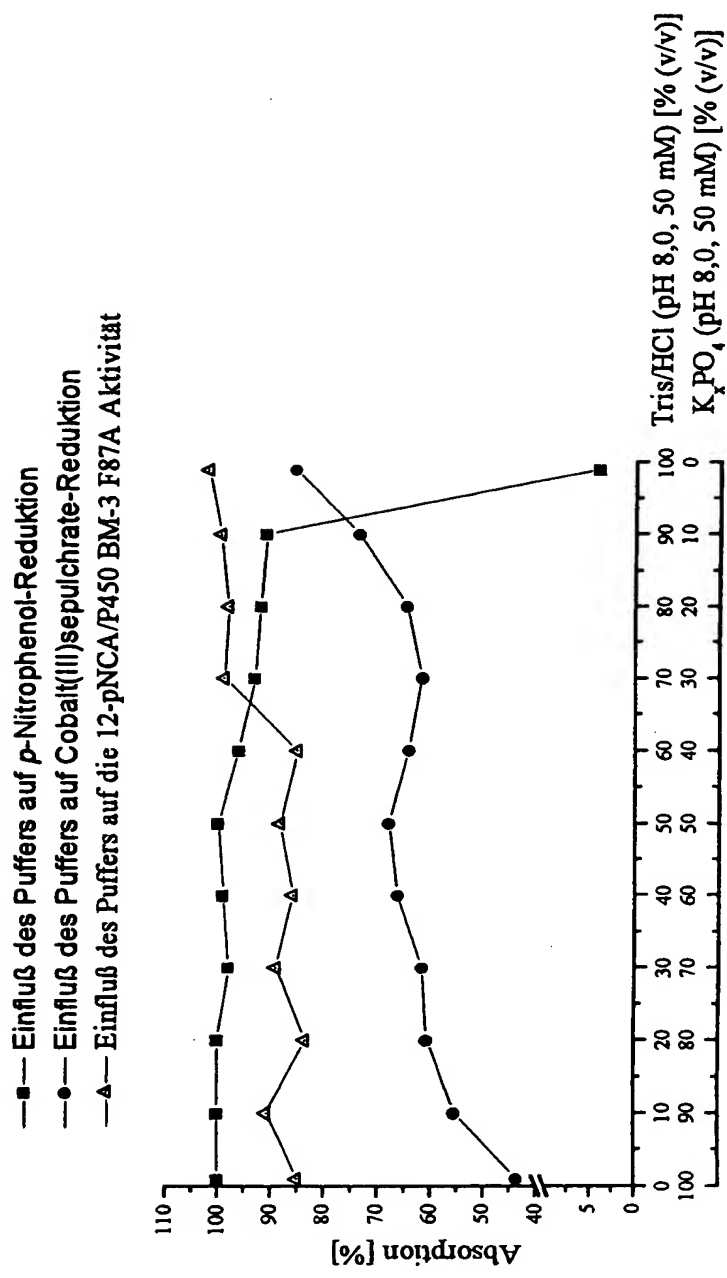


Fig.7

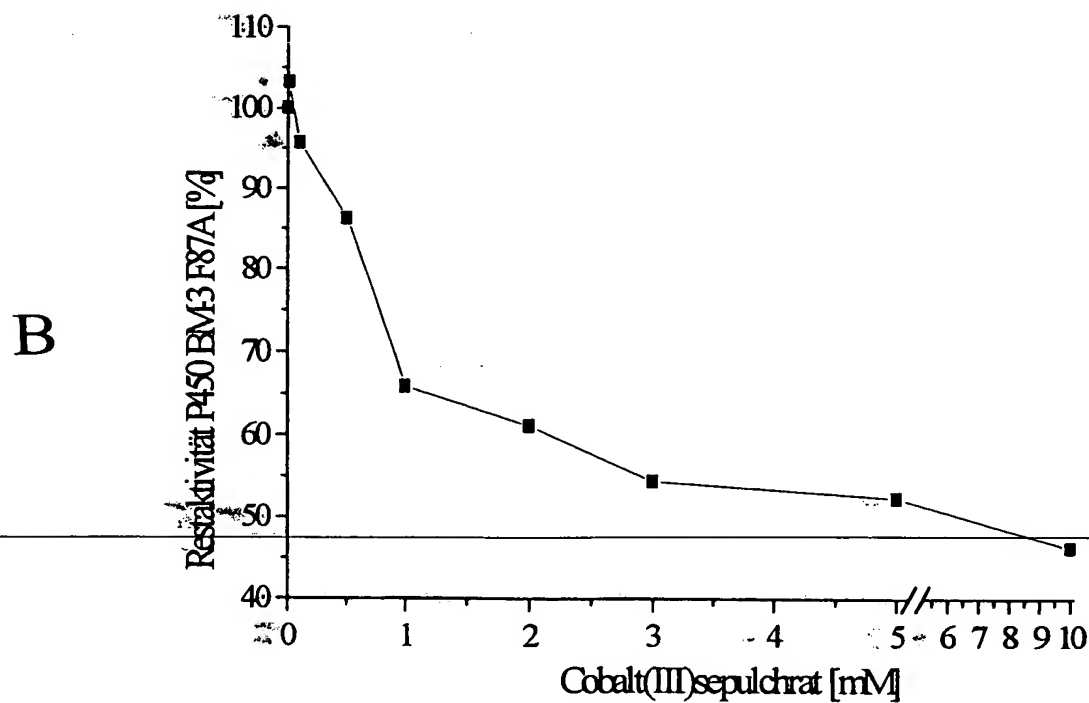
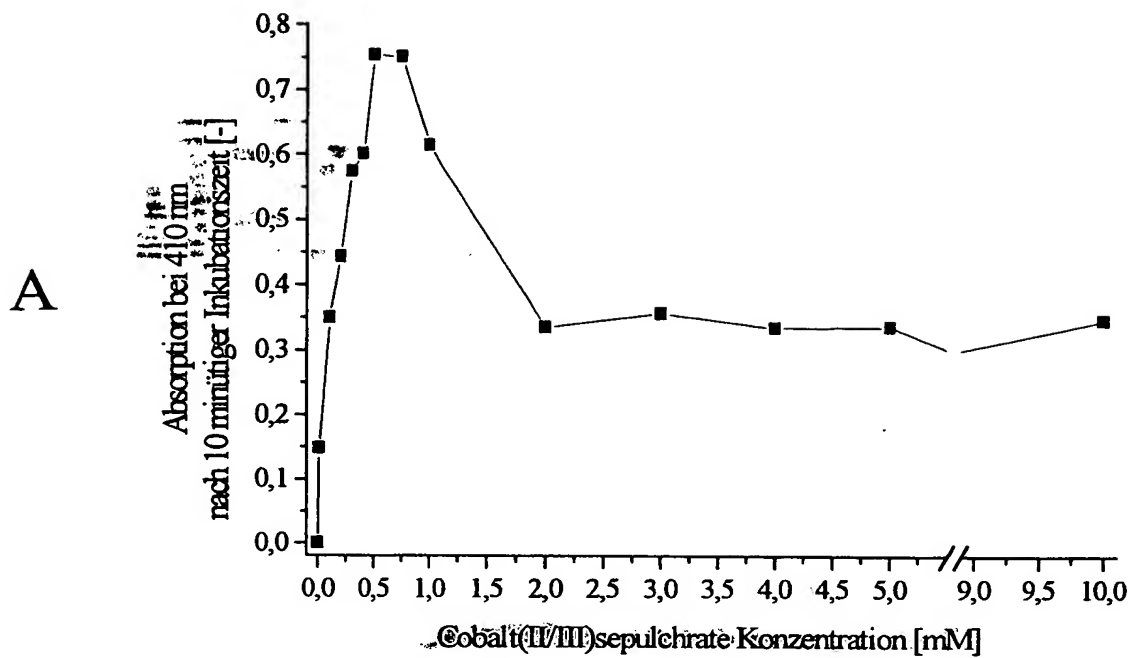


Fig.8

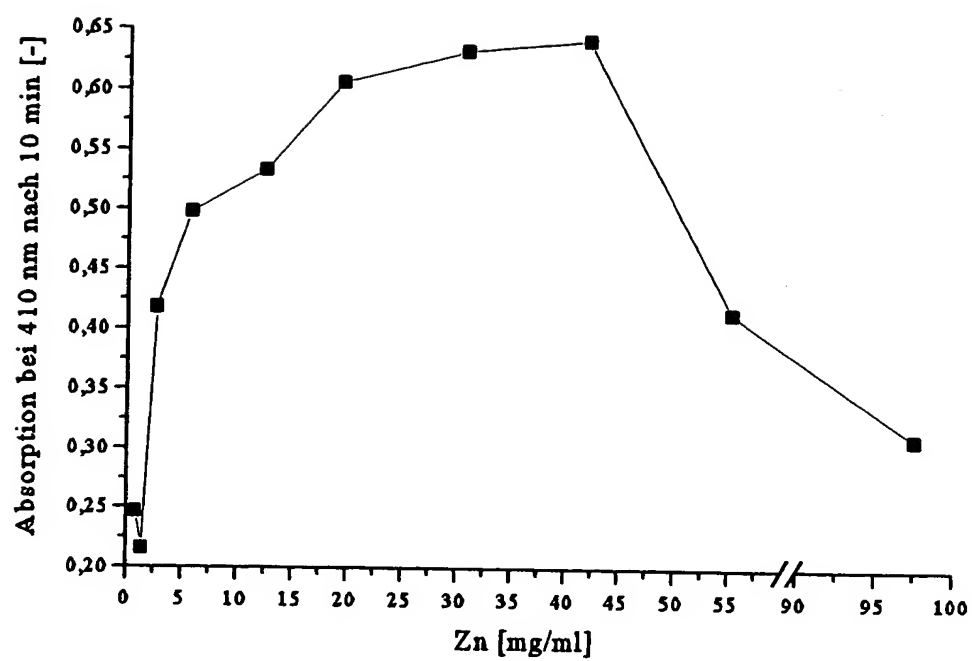


Fig.9

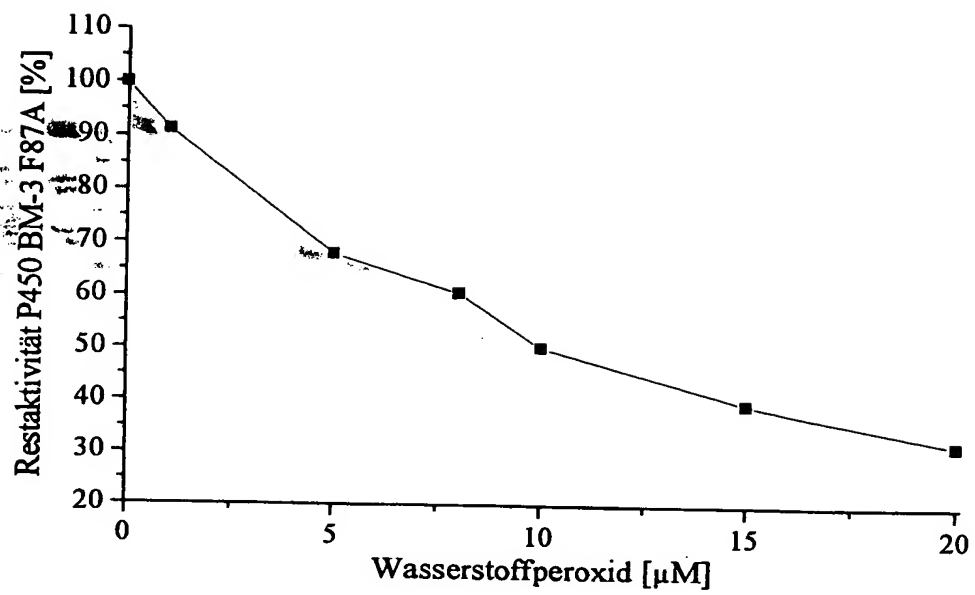


Fig. 10